

BEST AVAILABLE COPY

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 3月23日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-082890

出 願 人

Applicant(s):

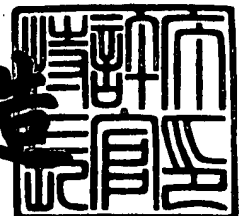
オリンパス光学工業株式会社  
株式会社日本ローパー  
科学技術振興事業団

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2001年 5月25日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3045674

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 NP99482-KT  
 【提出日】 平成12年 3月23日  
 【あて先】 特許庁長官 殿  
 【国際特許分類】 G01N 21/64  
 【発明の名称】 二重共鳴吸収顕微鏡  
 【請求項の数】 6  
 【発明者】

【住所又は居所】 東京都青梅市河辺町4-21-5-206

【氏名】 池滝 慶記

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県岡崎市竜美南2-3-1

6号棟303号

【氏名】 藤井 正明

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市戸塚区平戸5-10-9

【氏名】 尾松 孝茂

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市幸区塚越4-320-4-1209

【氏名】 佐藤 卓

【特許出願人】

【識別番号】 000000376

【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社

【特許出願人】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬1-3

【氏名又は名称】 株式会社日本ローパー

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 二重共鳴吸収顕微鏡

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料分子を基底状態から第一電子励起状態へ励起させるポンプ光の光源と、第一電子励起状態の試料分子を第二電子励起状態またはより高い励起状態へ励起させるイレース光の光源とを備え、各励起状態の試料分子が基底状態へ脱励起する際の発光を検出する二重共鳴吸収顕微鏡において、

ポンプ光が、基底状態の試料分子を第一電子励起状態へ励起させる励起エネルギーの  $1/2$  以下である光子エネルギーを有していることを特徴とする二重共鳴吸収顕微鏡。

【請求項 2】 試料分子を基底状態から第一電子励起状態へ励起させるポンプ光の光源と、第一電子励起状態の試料分子を第二電子励起状態またはより高い励起状態へ励起させるイレース光の光源とを備え、各励起状態の試料分子が基底状態へ脱励起する際の発光を検出する二重共鳴吸収顕微鏡において、

イレース光が、第一電子励起状態の試料分子を第二電子励起状態へ励起させる励起エネルギーの  $1/2$  以下である光子エネルギーを有していることを特徴とする二重共鳴吸収顕微鏡。

【請求項 3】 試料分子を基底状態から第一電子励起状態へ励起させるポンプ光の光源と、第一電子励起状態の試料分子を第二電子励起状態またはより高い励起状態へ励起させるイレース光の光源とを備え、各励起状態の試料分子が基底状態へ脱励起する際の発光を検出する二重共鳴吸収顕微鏡において、

ポンプ光が、基底状態の試料分子を第一電子励起状態へ励起させる励起エネルギーの  $1/2$  以下である光子エネルギーを有しており、イレース光が、第一電子励起状態の試料分子を第二電子励起状態へ励起させる励起エネルギーの  $1/2$  以下である光子エネルギーを有していることを特徴とする二重共鳴吸収顕微鏡。

【請求項 4】 第一電子励起状態の試料分子からの発光の光子エネルギー帯域と、第一電子励起状態の試料分子を第二電子励起状態またはより高い励起状態へ励起させる励起エネルギー帯域とが重複している請求項 1 ないし 3 のいずれかの二重共鳴吸収顕微鏡。

【請求項5】 ポンプ光およびイレース光の照射領域を一部分重ね合わせる重ね手段を備え、この重ね手段を介してポンプ光およびイレース光を試料に照射することにより、第一電子励起状態の試料分子が基底状態へ脱励起する際の発光領域を一部分抑制する請求項1ないし4のいずれかの二重共鳴吸収顕微鏡。

【請求項6】 試料は、基底状態を含め少なくとも三つの電子状態を有する蛍光ラベラー分子により染色されており、前記試料分子はこの蛍光ラベラー分子である請求項1ないし5のいずれかの二重共鳴吸収顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、二重共鳴吸収過程を利用した顕微鏡である二重共鳴吸収顕微鏡に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、背景光（励起光）の蛍光信号への混入に起因したS/Nの劣化を抑制することができ、且つ、優れた三次元空間分解能をも有する、新しい二重共鳴吸収顕微鏡に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、レーザー技術や電子画像技術をはじめとする周辺技術の進歩にともない、様々なタイプの高性能かつ多機能な顕微鏡が開発されてきている。本願発明の発明者も、その一つとして、複数波長の光を試料に照明することによって発生する二重共鳴吸収過程を用いて、得られる画像のコントラスト制御および試料の化学分析を可能とする顕微鏡（以下、二重共鳴吸収顕微鏡と呼ぶ）をすでに提案している（特願平6-329165参照）。

【0003】

この二重共鳴吸収顕微鏡では、二重共鳴吸収過程を用いて特定の分子を選択し、特定の光学遷移に起因する吸収および蛍光を観測することができる。その原理を説明すると、まず、基底状態（ $S_0$ 状態：図1）の試料分子（つまり、試料を構成する分子）が持つ価電子軌道の電子を、レーザー光などの共鳴波長 $\lambda_1$ 光により第一電子励起状態へ励起させ（ $S_1$ 状態：図2）、続いて共鳴波長 $\lambda_2$ 光によ

り第二電子励起状態またはさらに高位の励起状態へ励起させる ( $S_2$  状態: 図3)。分子は、この励起状態から蛍光あるいは燐光を発光したりして基底状態に戻る (図4)。そして、図2に示した吸収や図4に示した蛍光や燐光の発光を用いて吸収像や発光像を観察する。

## 【0004】

$S_1$  状態への励起過程においては、単位体積内の  $S_1$  状態の分子数は照射する光の強度が増加するにしたがって増加する。線吸収係数は、分子一個当たりの吸収断面積と単位体積当たりの分子数の積で与えられるので、 $S_2$  状態への励起過程においては続いて照射する共鳴波長  $\lambda_2$  に対する線吸収係数は最初に照射した共鳴波長  $\lambda_1$  の光の強度に依存する。すなわち、共鳴波長  $\lambda_2$  (以下、波長  $\lambda_2$  と略称) に対する線吸収係数は共鳴波長  $\lambda_1$  (以下、波長  $\lambda_1$  と略称) の光の強度で制御できる。このことは、波長  $\lambda_1$  および波長  $\lambda_2$  の2波長の光で試料を照射し、波長  $\lambda_2$  による透過像を撮影すれば、透過像のコントラストを波長  $\lambda_1$  の光で完全に制御できることを示している。また、 $S_2$  状態からの蛍光または燐光による脱励起過程が可能である場合には、その発光強度は  $S_1$  状態にある分子数に比例する。したがって、蛍光顕微鏡として利用する場合にも画像コントラストの制御が可能となる。

## 【0005】

また、この二重共鳴吸収顕微鏡は、コントラストの制御のみならず、化学分析も可能にする。図1に示される最外殻価電子軌道は個々の分子に固有なエネルギー準位をもつので、波長  $\lambda_1$  は分子によって異なる。同時に波長  $\lambda_2$  も分子固有のものとなる。単一波長で照明・観察を行う従来の顕微鏡においても、ある程度は特定の分子の吸収像あるいは蛍光像を観察することが可能ではあるが、一般にはいくつかの分子の吸収帯の波長領域は重複するため、試料の化学組成の正確な同定までは不可能である。これに対し、二重共鳴吸収顕微鏡では波長  $\lambda_1$  および波長  $\lambda_2$  の2波長により吸収あるいは発光する分子を限定するので、従来技術よりも正確な試料の化学組成の同定が可能となる。また、価電子を励起する場合、分子軸に対して特定の電場ベクトルを持つ光のみが強く吸収されるので、波長  $\lambda_1$  および波長  $\lambda_2$  の偏光方向を決めて、吸収像または蛍光像を撮影すれば、同じ分

子でも配向方向の同定をも行うことができる。

【 0 0 0 6 】

本願発明の発明者はさらに、回折限界を越える高い空間分解能の二重共鳴吸収顕微鏡をも提案している（特願平 8 - 3 0 2 2 3 2 参照）。二重共鳴吸収過程については、図 5 に例示したように  $S_2$  状態からの蛍光が極めて弱くなるある種の分子が存在する。このような光学的性質を持つ分子に対しては、以下のような極めて興味深い現象が起きる。図 6 は、図 5 と同じく二重共鳴吸収過程の概念図であるが、横軸に X 軸を設けて空間的距離の広がり表現しており、波長  $\lambda_1$  光および波長  $\lambda_2$  光が照射されている空間領域  $A_1$ （＝蛍光抑制領域）と、波長  $\lambda_1$  光のみが照射されて波長  $\lambda_2$  光が照射されていない空間領域  $A_0$ （＝蛍光領域）について示している。空間領域  $A_0$  では波長  $\lambda_1$  光による励起によって  $S_1$  状態の分子が多数生成される。このとき空間領域  $A_0$  からは波長  $\lambda_3$  で発光する蛍光が見られる。しかし空間領域  $A_1$  では、波長  $\lambda_2$  光が照射されるので、 $S_1$  状態の分子が即座に高位の  $S_2$  状態へと励起され、 $S_1$  状態の分子は存在しなくなる。このため空間領域  $A_1$  においては、波長  $\lambda_3$  の蛍光は全く発生せず、しかも  $S_2$  状態からの蛍光はもともとないので、完全に蛍光自体が抑制されることとなる。すなわち蛍光が発生するのは空間領域  $A_0$  のみとなる。このような現象の発生が数種類の分子において確認されている。

【 0 0 0 7 】

したがって、従来の走査型レーザー顕微鏡などでは、レーザー光を集光して観察試料上に形成されるマイクロビームのサイズが集光レンズの開口数と波長による回折限界で決まるので、それ以上の空間分解能が原理的に期待できないのに対し、図 6 で示した現象によれば波長  $\lambda_1$  光と波長  $\lambda_2$  光を空間的に一部分重ね合わせることで、波長  $\lambda_2$  光の照射で蛍光領域が抑制されるため、たとえば波長  $\lambda_1$  光の照射領域に着目すると、蛍光領域は集光レンズの開口数と波長とで決まるビームのサイズよりも狭くなっており、実質的に空間分解能の向上が図られている。本願発明者による二重共鳴吸収顕微鏡（特願平 8 - 3 0 2 2 3 2 参照）は、この原理を用いて、回折限界を越える超解像顕微鏡を実現しているのである。

【 0 0 0 8 】

そして本願発明の発明者は、この二重共鳴吸収顕微鏡の超解像性をさらに高めるべく、その機能を十分に活かすための試料の調整や波長 $\lambda_1$ 光・波長 $\lambda_2$ 光の試料への照射タイミングなどをもすでに提案している（特願平9-255444参照）。より具体的には、試料を染色分子により染色する。この染色分子として、基底状態を含め少なくとも3つの量子状態（ $S_0$ 状態、 $S_1$ 状態、 $S_2$ 状態・・・）を有し、且つ $S_1$ 状態を除く高位の量子状態から基底状態へ脱励起するときの遷移において蛍光による緩和過程よりも熱緩和過程が支配的である各種分子（以下、蛍光ラベラー分子と呼ぶ）を用いるのである。このような蛍光ラベラー分子と生化学的な染色技術を施した生体分子とを化学結合させてなる試料に、波長 $\lambda_1$ 光を照射して蛍光ラベラー分子を $S_1$ 状態に励起させ、続いて即座に波長 $\lambda_2$ 光を照射して蛍光ラベラー分子をより高位の量子準位に励起させることで、 $S_1$ 状態からの蛍光を効果的に抑制できるようになる。この際に、上述したような空間的な蛍光領域の人為的な抑制を行うことにより、空間分解能のさらなる向上が実現される。

## 【0009】

上記の蛍光ラベラー分子の光学的性質は、以下のように量子化学的な見地から説明できる。一般に、分子はそれを構成する各原子の $\sigma$ または $\pi$ 結合によって結ばれている。言い換えると、分子の分子軌道は $\sigma$ 分子軌道または $\pi$ 分子軌道をもっていて、これらの分子軌道に存在する電子が各原子を結合する重要な役割を担っている。そのなかでも、 $\sigma$ 分子軌道の電子は、各原子を強く結合し、分子の骨格である分子内の原子間距離を決める。これに対して、 $\pi$ 分子軌道の電子は、各原子の結合にほとんど寄与しないで、むしろ分子全体に極めて弱い力で束縛される。

## 【0010】

多くの場合、 $\sigma$ 分子軌道にいる電子を光で励起させると、分子の原子間隔が大きく変化し、分子の解離を含む大きな構造変化が起こる。その結果として、原子の運動エネルギーや構造変化するために光が分子に与えたエネルギーのほとんどが熱エネルギーに形を変える。したがって、励起エネルギーは蛍光という光の形態で消費されない。また、分子の構造変化は極めて高速におこるので（たとえば



ピコ秒より短い)、その過程で仮に蛍光が起きても極めて蛍光寿命が短い。しかしそれに対して、 $\pi$ 分子軌道の電子が励起しても、分子の構造自体はほとんど変化せず、高位の量子的な離散準位に長時間とどまり、ナノ秒のオーダーで蛍光を放出して脱励起する性質を持つ。

## 【0011】

量子化学よれば、分子が $\pi$ 分子軌道を持つことと、二重結合を持つことは同等であり、用いる蛍光ラベラー分子には、二重結合を豊富に持つ分子を選定することが必要条件となる。そして、二重結合を持つ分子でもベンゼンやピラジンなどの6員環分子においては、 $S_2$ 状態からの蛍光が極めて弱いことが確かめられている(例えば、M..Fujii et.al., Chem. Phys. Lett. 171 (1990) 341)。したがって、ベンゼンやピラジンなどの6員環分子を含む分子を蛍光ラベラー分子として選定すれば $S_1$ 状態からの蛍光寿命が長くなり、しかも光照射により $S_1$ 状態から $S_2$ 状態に励起させることで分子からの蛍光を容易に抑制でき、上述の二重共鳴吸収顕微鏡の超解像性を効果的に利用することができるようになる。

## 【0012】

すなわち、これらの蛍光ラベラー分子により試料を染色して観察を行えば、高空間分解能の蛍光像を取得することができるだけでなく、その蛍光ラベラー分子の側鎖の化学基を調整することにより生体試料の特定の化学組織のみを選択的に染色でき、試料の詳細な化学組成までも分析可能となる。

## 【0013】

一般に、二重共鳴吸収過程は二つの光の波長や偏光状態等が特定の条件を満たす場合のみに起こるので、これを用いることで非常に詳細な分子の構造を知ることが可能となる。すなわち、光の偏光方向と分子の配向方向とは強い相関関係があり、二波長光それぞれの偏光方向と分子の配向方向とが特定の角度をなすとき二重共鳴吸収過程が強く起こる。したがって、二波長光を試料に照射して、各光の偏光方向を回転することにより、蛍光の消失の程度が変化するので、その様子から観察しようとする組織の空間配向の情報も得られる。さらに、二つの波長の光を調整させることでこのことが可能である。

## 【0014】

他方、波長 $\lambda_1$ 光と波長 $\lambda_2$ 光の照射タイミングを適当なものに調整することにより（特願平9-255444参照）、蛍光像のS/Nを改善し、且つ蛍光抑制をさらに効果的に起こすことも可能となっている。

## 【0015】

また、本願発明の発明者により、波長 $\lambda_1$ 光と波長 $\lambda_2$ 光の照射タイミングのさらなる工夫により、S/Nおよび蛍光抑制のさらなる向上を実現することも提案されている（特願平10-97924参照）

ところで、前述した波長 $\lambda_1$ 光の照射領域の一部分への波長 $\lambda_2$ 光の照射領域の重ね合わせは、波長 $\lambda_2$ 光を中空ビーム化して、つまり中央部（軸近傍領域）がゼロ強度であり、且つ軸対象な強度分布を有する中空ビーム光にして、波長 $\lambda_1$ 光の一部分と空間的に重ね合わせ、試料上に集光することで実現できる。図7は、この重ね合わせおよびそれによる蛍光抑制を例示した概念図である。中空ビーム化した波長 $\lambda_2$ 光の重ね合わせにより、波長 $\lambda_2$ 光の強度がゼロとなる光軸近傍の領域以外では蛍光は抑制され、波長 $\lambda_1$ 光の広がりよりも狭い領域に存在する蛍光ラベラー分子の蛍光のみが観察される。その結果、超解像性が発現する。また波長 $\lambda_2$ 光の中空ビーム化では、たとえば図8に例示したように、光軸に対して点対称な位置となる位相差 $\pi$ を通過光に与える位相板を用いることができる。

## 【0016】

## 【発明が解決しようとする課題】

さて、以上のように本願発明の発明者によってこれまで開発されてきた二重共鳴吸収顕微鏡は、その超解像性と分析能力において際立った有用性と技術的優位性を示しているものの、未だに以下に示すような改良すべき点が残されているのが実情である。なおここからは、試料分子（＝試料を構成する分子）を $S_0$ 状態から $S_1$ 状態へ励起させる光をポンプ光、 $S_1$ 状態の分子を $S_2$ 状態へ励起させる光をイレース光と呼ぶこととする。また、蛍光ラベラー分子を用いて試料を染色する場合には、試料分子とはこの蛍光ラベラー分子のこととなる。

## 【0017】

まず第一に、励起対象の分子によっては、その分子からの蛍光の波長帯域と、その分子を励起させるイレース光およびポンプ光の波長とが近接または重複する

ことがあり、そのため、蛍光信号の検出の際に励起光が背景光となって、本来測定すべき蛍光信号の抽出が困難となる場合があった。特にイレース光は、分子を  $S_1$  状態から  $S_2$  状態へ励起させる必要があるので強度が比較的強く、その影響は特に考慮する必要がある。たとえば、先行例（特願平 1 0 - 9 7 9 2 4）では、試料を蛍光ラベラー分子で染色する場合、蛍光ラベラー分子としてローダミン 6 G (Rhordamin-6G) を用いたとすると、図 9 に例示したように、このローダミン 6 G の蛍光帯域は約 5 3 0 n m から 6 5 0 n m の波長領域に広がっており、ローダミン 6 G に対するポンプ光の波長は 5 3 2 n m、イレース光の波長は 5 9 9 n m となるため、蛍光帯域と励起波長とが重複してしまう。このため、蛍光像の  $S/N$  が良好なものとならないといった問題があった。

## 【 0 0 1 8 】

また第二に、近年の顕微鏡の高性能化において、光軸方向の深さ分解能、つまり三次元空間分解能を実現することは大きな課題となっているが、他の従来の光学顕微鏡と同様、二重共鳴吸収顕微鏡も光軸方向の深さ分解能を持ち合わせていないのである。前述したようにポンプ光とイレース光の照射領域を一部分重ね合わせた場合における空間分解能の向上は、平面分解能のみについてのものである。イレース光が重なっているポンプ光のビーム周縁領域では蛍光が抑制されるが、イレース光の中空部の光軸上では全く蛍光が抑制されず、光軸上にある分子が発光する。すなわち、原理的には光軸方向の深さ分解能は無いことになる。深さ分解能を持たせるために、たとえば検出器の全面で且つ共焦点位置にピンホールを設置することも可能であるが、実用上、ピンホールを含む結像光学系のアライメントが複雑化したり、検出器に到達する蛍光の光子数が低下したりするという問題点がある。したがって、結像光学系等の構成が複雑化することなく、平面分解能とともに深さ分解能をも持ち合わせることは、従来には全くない、極めて高性能な顕微鏡を実現することになるのである。

## 【 0 0 1 9 】

この出願の発明は、以上の通りの事情に鑑みてなされたものであり、二重共鳴吸収顕微鏡を改良し、背景光（励起光）の蛍光信号への混入に起因した  $S/N$  の劣化を抑制することができ、且つ、優れた三次元空間分解能をも有する、新しい

二重共鳴吸収顕微鏡を提供することを課題としている。

【0020】

【課題を解決するための手段】

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、試料分子を基底状態から第一電子励起状態へ励起させるポンプ光の光源と、第一電子励起状態の試料分子を第二電子励起状態またはより高い励起状態へ励起させるイレース光の光源とを備え、各励起状態の試料分子が基底状態へ脱励起する際の発光を検出する二重共鳴吸収顕微鏡において、ポンプ光が、基底状態の試料分子を第一電子励起状態へ励起させる励起エネルギーの $1/2$ 以下である光子エネルギーを有していることや、イレース光が、第一電子励起状態の試料分子を第二電子励起状態へ励起させる励起エネルギーの $1/2$ 以下である光子エネルギーを有していることや、ポンプ光およびイレース光それぞれが上記光子エネルギーを有していることを特徴とする二重共鳴吸収顕微鏡（請求項1～3）を提供する。

【0021】

また、この出願の発明は、この二重共鳴吸収顕微鏡において、第一電子励起状態の試料分子からの発光の光子エネルギー帯域と、第一電子励起状態の試料分子を第二電子励起状態またはより高い励起状態へ励起させる励起エネルギー帯域とが重複していること（請求項4）をその態様として提供する。

【0022】

さらにまた、上記の二重共鳴吸収顕微鏡において、平面方向の超解像性を持たせるべく、ポンプ光およびイレース光の照射領域を一部分重ね合わせる重ね手段を備え、この重ね手段を介してポンプ光およびイレース光を試料に照射することにより、第一電子励起状態の試料分子が基底状態へ脱励起する際の発光領域を一部分抑制すること（請求項5）や、その超解像性の実現をより効果的なものとするべく、試料が基底状態を含め少なくとも三つの電子状態を有する蛍光ラベラー分子により染色されており、前記試料分子がこの蛍光ラベラー分子となっていること（請求項6）をその態様として提供する。

【0023】

【発明の実施の形態】

この出願の発明は、上記の通り、二重共鳴吸収顕微鏡において、ポンプ光が、 $S_0$ 状態の試料分子（または蛍光ラベラー分子）を $S_1$ 状態へ励起させる励起エネルギーの $1/2$ 以下である光子エネルギーを有していることや、イレース光が、 $S_1$ 状態の試料分子（または蛍光ラベラー分子）を $S_2$ 状態へ励起させる励起エネルギーの $1/2$ 以下である光子エネルギーを有していることを特徴としている。すなわち、この出願の発明の二重共鳴吸収顕微鏡は、非共鳴光学効果の一つである非共鳴多光子励起過程を利用しているのである。

## 【0024】

ここで、二光子の場合の非共鳴多光子励起過程（非共鳴二光子励起過程と呼ぶ）について説明する。非共鳴二光子励起過程とは、たとえば図10に例示したように、ある二つのエネルギー準位（＝電子励起状態： $S_0$ と $S_1$ ）をもった物質を仮定し、それら準位間のエネルギーを $E_{01}$ としたとき、 $E_{01}$ の半分の光子エネルギー $E_{01}/2$ を有する高いフォトンフラックスの光を物質に入射させると、 $S_0$ から $S_1$ への遷移が可能になるという効果のことである。

## 【0025】

量子力学の2次までの摂動計算によれば、非共鳴二光子励起過程による $S_0$ から $S_1$ への遷移確率 $a(S_0 \rightarrow S_1)$ は次式で与えられる。

## 【0026】

【数1】

$$|a_2(S_0 \rightarrow S_1)|^2 = \frac{d}{dt} \left( \frac{eF}{h} \right)^4 \cdot \left| \frac{x_{j1} \int_0^t \sin(\omega t') \exp(i\omega_{j1}) dt'}{x_{0j} \int_0^t \sin(\omega t'') \exp(i\omega_{0j}) dt''} \right|^2$$

## 【0027】

この数1において、

$F \sin(\omega t)$  = 励起光の振幅

$-e r$  = 試料分子の電気双極子モーメント

$\omega$  = 励起光の角振動数

$h$  = プランク定数

$t$  = 時刻

$t'$ ,  $t''$  =  $t$  の積分変数

$\omega_{j0}$ ,  $\omega_{1j}$  = ある  $j$  というバーチャルな量子状態を仮定したときの  
試料分子の共鳴周波数

$x_{j1}$ ,  $x_{0j}$  =  $S_1$  および  $S_2$  間の電気双極子モーメントの行列要素  
である。

【0028】

また、 $x_{j1}$ ,  $x_{0j}$  は次式で与えられる。

【0029】

【数2】

$$x_{km} = \int u_k^* x u_m dv$$

【0030】

この数2において、

$u_k$ ,  $u_m$  = 遷移に関与する分子の終状態  $k$  と始状態  $m$  の波動関数  
である。

【0031】

一方、通常の一光子励起過程の場合は、バーチャルな中間状態を経ずに励起する遷移過程となり、その遷移確率は1次の摂動論を用いて次式で与えられる。

【0032】

【数3】

$$|a_1(S_0 \rightarrow S_1)|^2 = \frac{d}{dt} \left( \frac{eF}{h} \right)^2 \cdot$$

$$\left| x_{01} \int_0^t \sin(\omega t') \exp(i\omega_{01} t) dt' \right|^2$$

## 【0033】

数1と数3を比較すると明らかなように、 $S_0$ から $S_1$ への遷移確率は、非共鳴二光子励起過程の場合には励起光の振幅強度の4乗に比例（言い換えると、励起光の強度の2乗に比例）し、一光子励起過程の場合には励起光の振幅強度の2乗に比例（言い換えると、励起光の強度に線形比例）する。すなわち、非共鳴二光子励起過程の場合には蛍光強度も励起光の強度のほぼ2乗に比例し、一光子励起過程の場合には蛍光強度も線形比例することになる。

## 【0034】

したがって、このような非共鳴二光子励起過程を二重共鳴吸収過程に組み合わせる、すなわち、 $S_0$ 状態から $S_1$ 状態への励起（以下、 $S_0 \rightarrow S_1$ 励起と略称）や $S_1$ 状態から $S_2$ 状態への励起（以下、 $S_1 \rightarrow S_2$ 励起と略称）に非共鳴二光子励起過程を用いれば、極めて優れた $S/N$ の蛍光信号を得ることができるのである。

## 【0035】

この原理を、図11および図12を用いて説明する。図11は、二重共鳴吸収過程および非共鳴二光子励起過程の組合せを蛍光ラベラー分子のエネルギーダイヤグラムとともに概念的に例示したものである。図12は、励起光の光子エネルギーと試料分子の吸収・蛍光強度スペクトルとの関係を例示したものである。まず、図11に例示したように、通常の $S_0 \rightarrow S_1$ 励起に必要なエネルギーの半分の光子エネルギー $E_{01}/2$ （波長に換算すると、通常の $S_0 \rightarrow S_1$ 励起の場合の2倍の長さ： $2\lambda_1$ ）を持つポンプ光で、 $S_0$ から仮想的準位 $S_{V0}$ を介して $S_1$ への励起を行う。引き続き、通常の $S_1 \rightarrow S_2$ 励起に必要なエネルギーの半分の光子エネルギー $E_{12}/2$ （波長に換算すると、通常の $S_1 \rightarrow S_2$ 励起の場合の2倍の長さ： $2\lambda_2$ ）を持つイレース光で、 $S_1$ から仮想的準位 $S_{V1}$ を介して $S_2$ への励起を行う。なお、 $E_{12}/2$ のイレース光は、 $E_{01}/2$ のポンプ光の照射後、 $S_1$ の分子が蛍光を発する前に、試料へ照射する。

## 【0036】

そして、たとえば図12に例示したように、二重共鳴吸収過程のみの場合においては、波長 $\lambda_1$ を持つポンプ光の光子エネルギー $E_{01}$ は $S_0 \rightarrow S_1$ 吸収帯域に属しており、波長 $\lambda_2$ を持つイレース光の光子エネルギー $E_{12}$ は $S_1 \rightarrow S_2$ 吸収帯域

にも蛍光帯域にも属しているが、これに対し、波長  $2\lambda_1$  を持つポンプ光の光子エネルギー  $E_{01}/2$  および波長  $2\lambda_2$  を持つイレース光の光子エネルギー  $E_{12}/2$  は、 $S_0 \rightarrow S_1$  吸収帯域、 $S_1 \rightarrow S_2$  吸収帯域、蛍光帯域のいずれにも属していない。

## 【0037】

したがって、波長  $2\lambda_1$  ・光子エネルギー  $E_{01}/2$  のポンプ光で  $S_1$  状態の試料分子（または蛍光ラベラー分子）を生成し、この  $S_1$  状態の分子が蛍光を発する前に波長  $2\lambda_2$  ・光子エネルギー  $E_{12}/2$  のイレース光によって  $S_2$  状態に励起することで、励起波長は蛍光帯域よりも遥かに低いエネルギー領域に存在して、蛍光帯域に重なることがないので、励起光が背景光として混入していない、極めて良好な  $S/N$  の蛍光信号を取得することができるのである。

## 【0038】

また、 $S_0 \rightarrow S_1$  励起、 $S_1 \rightarrow S_2$  励起のいずれか一方について非共鳴二光子励起過程を用いる、すなわちポンプ光、イレース光のいずれか一方を励起エネルギーの  $1/2$  の光子エネルギーを有するものとしてもよい。通常の  $S_0 \rightarrow S_1$  励起波長と蛍光帯域が重なる場合、通常の  $S_1 \rightarrow S_2$  励起波長と蛍光帯域が重なる場合のいずれか一方が生じるときに、有効的である。

## 【0039】

さらにまた、以上の説明は、二光子の場合の非共鳴多光子励起過程についてのものであるが、同様にして三光子以上の非共鳴多光子励起過程を用いても、この発明の二重共鳴吸収顕微鏡では、励起光の混入を極めて効果的に防ぐことができる。n 次の非共鳴多光子励起過程では、ポンプ光およびイレース光は、通常の  $S_0 \rightarrow S_1$  励起、 $S_1 \rightarrow S_2$  励起に必要な励起エネルギーの  $1/n$  の光子エネルギーとなる。たとえば、三光子の非共鳴三光子励起過程では、ポンプ光およびイレース光の光子エネルギーは励起エネルギーの  $1/3$  であればよい。

## 【0040】

多くの蛍光ラベラー分子では、非共鳴多光子励起過程で用いる光子エネルギーは小さく、仮想的準位以外のいわゆる通常の電子励起準位は存在せず、ポンプ光およびイレース光に対して透明になる。この性質を利用することにより、極めて



優れた性能の超解像顕微鏡が実現できる。

【0041】

またさらに、この非共鳴多光子励起過程を用いることで、二重共鳴吸収顕微鏡に光軸方向の深さ分解能、つまり三次元空間分解能を付与することができる。ここでも説明の簡略化のため、非共鳴二光子励起過程を基にして説明する。

【0042】

励起光として波長 $\lambda_1$ 光、集光レンズとして無収差の光学系を仮定するとき、光学系の開口（開口数：NA）一杯で波長 $\lambda_1$ 光を集光すると、その像空間 $(x, y, z)$ における三次元複素振幅分布 $I(x, y, z)$ は、次式で与えられる。

【0043】

【数4】

$$I(x, y, z) = \iint_{NA} e^{-\frac{z}{2f^2}(\xi^2 + \zeta^2)} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda}(x\xi + y\zeta)} d\xi d\zeta$$

【0044】

ただし、 $f$ は焦点距離、 $(\xi, \zeta)$ は瞳面の座標である。積分領域は全開口である。

【0045】

前記数3によれば、波長 $\lambda_1$ 光を照射し、通常の一光子励起過程で試料分子を $S_1$ 状態に励起すると、その励起分子量 $q_{one}(x, y, z)$ は $I(x, y, z)^2$ に比例する。一方、数4によれば、波長 $2\lambda_1$ 光により非共鳴二光子励起過程で試料分子を励起すると、その励起分子量 $q_{two}(x, y, z)$ は $I(x, y, z)^4$ に比例する。 $q_{one}(x, y, z)$ および $q_{two}(x, y, z)$ を規格化して周波数空間にフーリエ変換すると、実際に観察し得る解像度を示す物理量（三次元OTF）になる。すなわち、規格化した一光子励起過程の励起分子量および非共鳴二光子励起過程の励起分子量を $Q_{one}(x, y, z)$ と $Q_{two}(x, y, z)$ と書けば、下記の数5および数6のような関係となる。

【0046】

【数 5】

$$s_{one}(k1_x, k1_y, k1_z) = \iiint Q_{one}(k1_x, k1_y, k1_z) e^{-(xk1_x + yk1_y + zk1_z)} dx dy dz$$

【0 0 4 7】

【数 6】

$$s_{two}(k2_x, k2_y, k2_z) = \iiint Q_{two}(k2_x, k2_y, k2_z) e^{-(xk2_x + yk2_y + zk2_z)} dx dy dz$$

【0 0 4 8】

ここで、 $k1_x$ ,  $k1_y$ ,  $k1_z$ は波長 $\lambda_1$ の励起光に対する波数ベクトル成分であり、 $k2_x$ ,  $k2_y$ ,  $k2_z$ は波長 $2\lambda_1$ の励起光に対する波数ベクトル成分である。

【0 0 4 9】

仮に、瞳面は光軸対称として、 $r = (x^2 + y^2)^{1/2}$ なるパラメータを導入し、数5および数6を用いて、 $(k1_r, k1_z)$ および $(k2_r, k2_z)$ の空間分布の断面を求めると、図13(a)(b)に例示したようになる。 $k1_r$ および $k2_r$ は、各々、光軸からの動径方向に関する波長 $\lambda_1$ 光および波長 $2\lambda_1$ 光の波数ベクトル成分である。

【0 0 5 0】

図13(a)(b)によれば、非共鳴二光子励起過程も一光子励起過程も、動径方向の空間周波数帯域の上限 $K_{max}$ と下限 $K_{min}$ は光学系の開口数 $NA$ を用いて

【0 0 5 1】

【数 7】

$$K_{\max} = -K_{\min} = 2 \frac{NA}{\lambda l}$$

【0052】

で表され、空間分解能はほぼ同じである。しかし、光軸方向の分解能に関しては顕著な差がある。一光子励起過程では、原点を含む  $k_{1z}$  軸方向には値を持たないのである。すなわち、光軸方向には全く分解能を持たないことを示している。それに対して、非共鳴二光子励起過程では、光軸方向である  $k_{2z}$  軸方向にも、

【0053】

【数 8】

$$K_{\max} = -K_{\min} = \frac{(1 - (1 - NA^2)^{\frac{1}{2}})}{\lambda l}$$

【0054】

という値をもつことがわかる。つまり光軸方向の深さ分解能をもつのである。これは、前記数 1 が示すように、 $S_1$  状態の励起分子の発生量が励起光の 2 乗に比例するために、励起分子が極めて狭い空間領域に局在することに対応している。

【0055】

したがって、 $S_1$  状態の励起分子を生成する際に非共鳴二光子励起過程を用いることにより、すなわち基底状態の試料分子を  $S_1$  状態へ励起させる励起エネルギーの  $1/2$  である光子エネルギーを有しているポンプ光を用いることにより、二重共鳴吸収顕微鏡に光軸方向の深さ分解能を付加することができるのである。

【0056】

また、二重共鳴吸収顕微鏡を、前述したように、ポンプ光およびイレース光の照射領域を一部分重ね合わせる重ね手段（たとえばイレース光を中空ビーム化する位相板などを含んだ光学系）を介してポンプ光およびイレース光を試料に照射することにより、 $S_1$  状態の試料分子が基底状態へ脱励起する際の発光領域を一部分抑制する態様とすれば、優れた平面分解能とともに、深さ分解能を持ち合わ

せることができ、極めて高性能な超解像顕微鏡が実現される。

【 0 0 5 7 】

もちろん以上のことは、 $S_1 \rightarrow S_2$  励起のためのイレース光についても同様であり、通常の  $S_1 \rightarrow S_2$  励起に必要な励起エネルギーの  $1/2$  の光子エネルギーとすることにより、三次元空間分解能が実現される。また、三光子以上の非共鳴多光子励起過程を用いた場合でも、ポンプ光およびイレース光それぞれの光子エネルギーを  $1/n$  とすることで、同様に三次元空間分解能が実現される。

【 0 0 5 8 】

ここで以下に、試料を染色する蛍光ラベラー分子のうち、一光子励起過程の場合における励起光波長と蛍光波長とが近接または重なってしまうものを例記しておく。これらの蛍光ラベラー分子を用いて試料を染色した場合には、非共鳴二光子励起過程に起因するこの出願の発明の上記効果、すなわち背景光の混入していない蛍光信号の  $S/N$  の向上が、より顕著なものとなる。

【 0 0 5 9 】

[ 蛍光ラベラー分子の例 ]

2,2''-Dimethyl-p-terphenyl:

P-terphenyl (PTP):

3,3',2'',3''-Tetramethyl-P-quaterphenyl:

2,2''''-Dimethyl-P-quaterphenyl:

2-Methyl-5-t-butyl-p-quaterphenyl:

2-(4-Biphenyl)-5-(4-t-butylphenyl)-1,3,4-oxiazol (BPBD-365):

2-(4-Biphenyl)-phenyl-1,3,4-oxadiazol:

2,5,2''''5, ''''-Tetramethyl-p-quinqphenyl:

3,5,3''''5, ''''-Tetra-t-butyl-p-quinqphenyl:

2,5-Diphenyloxazol:

2,5-Diphenylfuran:

PQP(p-Quanterphenyl):

2,5-Bis-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol:

p-Quaterphenyl-4-4''''-disulfonicacid Disodiumsalt:

p-Quaterphenyl-4-4'''-disulfonicacid Dipotassiumsalt:

4,4'''-Bis-(2-butyloctyloxy)-p-quanterphenyl:

3,5,3''''5,''''-Tetra-t-butyl-p-sexiphenyl:

2-(1-Naphthyl)-5-phenyloxazol:

2-(4-Biphenyl)-6-phenylbenzoxazotetrasulfonicacid Potassium Salt:

2-(4-Biphenyl)-6-phenylbenzoxazol-1,3:

4,4'-Diphenylstilbene:

[1,1'-Biphenyl]-4-sulfonic acid, 4,4''-1,2-ethene-diylbis-,dipotassium salt:

2,5-Bis-(4-biphenyl)-oxazol:

2,2'-([1,1'-Biphenyl]-4,4'-diyl-di-2,1-ethenediyl)-bis-benzenesulfonic acid Disodium Salt:

7-Amino-4-methylcarbostyryl:

1,4-Di[2-(5-phenyloxazoly)] benzene:

7-Hydroxy-4-methylcoumarin:

p-Bis(o-methylstyryl)-benzene:

Benzofuran,2,2'-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl-bis-tetrasulfonic-acid:

7-Dimethylamino-4-methylquinolom-2:

7-Amino-4-methylcoumarin:

2-(p-Dimethylaminostyryl)-pyridylmethyl Iodide:

7-Diethylaminocoumarin:

7-Diethylamino-4-methylcoumarin:

2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-8-methylqinolizino-[9,9a,1-gh]-coumarin:

7-Diethylamino-4-trifluormethylcoumarin:

7-Dimethylamino-4-trifluormethylcoumarin:

7-Amino-4-trifluormethylcoumarin:

2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydroquinolizino-[9,9a,1-gh]-coumarin:

7-Ethylamino-6-methyl-4-trifluormethylcoumarin:

7-Ethylamino-4-trifluormethylcoumarin:

2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-9-carboethoxyquinolizino-- [9,9a,1-gh] coumarin:

2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-9-(3-pyridyl)-quinolizino- [9,9a,1-gh] coumarin:

3-(2'-N-Methylbenzimidazolyl)-7-n,n-diethylaminocoumarin:

2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-9-acetylquinolizino- [9,9a,1-gh] -coumarin:

N-Methyl-4-trifluormethylpiperidino- [3,2-g] -coumarin:

2-(p-Dimethylaminostyryl)-benzothiazolylethyl Iodide:

3-(2'-Benzimidazolyl)-7-N,N-diethylaminocoumarin:

Brillantsulfaflavin:

3-(2'-Benzothiazolyl)-7-diethylaminocoumarin:

2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-8-trifluormethylquinolizino- [9,9a,1gh] coumarin:

3,3'-Diethyloxacarbocyanine Iodide:

3,3'-Dimethyl-9-ethylthiacarbocyanine Iodide:

Disodium Fluorescein (Uranin):

9-(o-Carboxyphenyl)-2,7-dichloro-6-hydroxy-3H-xanthen-3-on2,7-Dichlorofluorescein · Fluorescein 548:

Fluorol 555 (Fluorol 7GA):

o-(6-Amino-3-imino-3H-xanthen-9-yl)-benzoic acid (Rhodamine 560):

Benzoic Acid, 2-[6-(ethylamino)-3-(ethylimino)-2,7-dimethyl-3H-xanthen-9-yl], perchlorate (Rhodamine 575):

Benzonic Acid, 2-[6-(ethylamino)-3-(ethylimino)-2,7-dimethyl-3H-xanthen-9-yl]-ethylester, monohydrochloride (Rhodamine 590):

1,3'-Diethyl-4,2'-quinolyloxacarbocyanine Iodide:

1,1'-Diethyl-2,2'-carbocyanine Iodide:

2-[6-(diethylamino)-3-(diethylimino)-3H-xanthen-9-yl] benzoic acid (Rhodamine 610):

Ethanaminium, N-[(6-diethylamino)-9-(2,4-disulfophenyl)-3H-xanthen-3-ylidene]-N-ethylhydroxid, inner salt, sodium salt:

Malachit Green:

3,3'-Diethylthiacarbocyanine Iodide:

1,3'-Diethyl-4,2'-quinolylthiacarbocyanine Iodide:  
 8-(2-Carboxyphenyl)-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinol  
 izino [9,9a,1-bc:  
 9',9a',1-hi] xanthylum Perchlorate  
 (Rhodamine640):  
 4-Dicyanmethylen-2-methyl-6-(p-dimethylaminostyryl)-4H-pyran:  
 3,3'-Diethyloxadibocyanine Iodide:  
 8-(2,4-Disulfophenyl)-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquin  
 olizino [9,9a,1-bc:9',1-hi] xanthene (Sulforhodamine 640):  
 5,9-Diaminobenzo [a] phenoxazonium Perchorate:  
 9-Diethylamino-5H-benzo(a)phenoxazin-5-one:  
 5-Amino-9-diethylimino(a)phenoxazonium Perchlorate:  
 3-Ethylamino-7-ethylimino-2,8-dimethylphenoxazin-5-ium Perchorate:  
 8-(Trifluoromethyl)-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinol  
 izino [9,9a,1-bc:9',9a,1-hi] xanthylum Perchlorate:  
 1-Ethyl-2-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-pyridinium Perchlor  
 ate:  
 Carbazine 122:  
 9-Ethylamino-5-ethylimino-10-methyl-5H-benzo(a)phenoxazoniumPerchlorate:  
 3-Diethylamino-7-diethyliminophenoxazonium Perchlorate:  
 3-Diethylthiadibocyanine Iodide:  
 Oxazine 750:  
 1-Ethyl-4-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-pyridinium Perchlo  
 rate:  
 1,1',3,3,3',3'-Hexamethylindodicarbocyanine Iodide:  
 1,1'-Diethyl-4,4'-carbocyanine Iodide:  
 2-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-1,3,3-trimethyl-3H-indolium  
 Perchlorate:  
 2-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-3-ethylbenzothiazolium Perc

hlorate:

1,1'-Diethyl-2,2'-dicarbocyanine Iodide:

1-Ethyl-4-(4-(9-(2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-benzo(i,j)-chinolinozinium))-1,3-buta dienyl)-pyridinium Perchlorate:

3,3'-Dimethyloxatricarbocyanine Iodide:

1-Ethyl-4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-buta dienyl)-quinolinium Perchlorate:

8-Cyano-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino [9,9a,1-bc:9a',1-hi] xanthylium Perchlorate (Rhodamine800):

2-(6-(4-Dimethylaminophenyl)-2,4-neopentylene-1,3,5)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate:

1,1',3,3,3',3'-Hexamethylindotricarbocyanine Iodide:

IR125 :

3,3'-Diethylthiatricarbocyanine Iodide :

IR144 :

2-(6-(9-(2,3,6,7-Tetrahydro-1H,5H-benzo(i,j)-chinolizinium))-2,4-neopentylene-1,3,5-hexatrienyl)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate:

3,3'-Diethyl-9,11-neopentylene-thiatricarbocyanine Iodide:

1,1',3,3,3',3'-Hexamethyl-4,4',5,5'-dibenzo-2,2'-indotricarbocyanine Iodide:

3,3'-Diethyl-4,4',5,5'-dibenzothiatricarbocyanine Iodide:

1,2'-Diethyl-4,4'-dicarbocyanine Iodide:

IR140:

2-(8-(4-p-Dimethylaminophenyl)-2,4-neopentylene-1,3,5,7-octatetraenyl)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate:

IR132 :

2-(8-(9-(2,3,6,7-Tetrahydro-1H,5H-benzo(i,j)chinolizinium))-2,4-neopentylene-1,3,5,7-octatetraenyl)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate:

IR26:



IR 5

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。

【0060】

【実施例】

〔実施例1〕

図14は、この発明の二重共鳴吸収顕微鏡の一例を示した要部構成の概略図である。この図14に例示した二重共鳴吸収顕微鏡はレーザー走査型蛍光顕微鏡を構成しており、二重共鳴吸収過程および非共鳴多光子励起過程の利用はもちろんのこと、ポンプ光およびイレース光の照射領域の一部重畳せをも行い得る態様となっている。このような図14の二重共鳴吸収顕微鏡について、〔A〕光源部・〔B〕試料観察系・〔C〕検出系に分けて以下に説明する。なお、非共鳴多光子励起過程は非共鳴二光子励起過程を用いるとし、試料(10)は、蛍光ラベラー分子としてのローダミン6Gにより染色した生体試料であるとする。

【0061】

〔A〕光源部

基本光源には、過飽和色素を用いたピコ秒パルスレーザー光を発するNd:YAGレーザー(1)を用い、その基本波(波長1064nm・光子エネルギー約1.165eV)からポンプ光およびイレース光を生成する。なおここでは、光子(電子)エネルギーeV=1239.8/波長nmを変換式とする。

【0062】

&lt;1&gt;ポンプ光

まず、ポンプ光について説明する。ローダミン6Gを通常の一光子励起過程で $S_0 \rightarrow S_1$ 励起させるには、約2.3eVの光子エネルギー $E_{01}$ が必要となる。またローダミン6Gは、約550nm、つまり光子エネルギーに換算して約2.25eV、から $S_0 \rightarrow S_1$ 吸収帯が始まる(図9参照)。したがって、波長 $2\lambda_1 =$ 約1064nm・光子エネルギー $E_{01}/2 =$ 約1.165eVを持つNd:YAGレーザー(1)からの基本波をポンプ光とすることで、ローダミン6Gを非共鳴二光子励起過程で $S_0 \rightarrow S_1$ 励起させることができる。

【 0 0 6 3 】

このような光子エネルギー  $E_{01}/2$ ・波長  $2\lambda_1$  を持つポンプ光の必要強度、つまりローダミン 6 G を非共鳴二光子励起過程で  $S_0 \rightarrow S_1$  励起させるのに必要な強度、について説明する。まず前記数 1 において、波長  $2\lambda_1$  のポンプ光のフォトンフラックスを  $I(2\lambda_1)$  とすると、単位時間内に非共鳴二光子励起過程で  $S_0 \rightarrow S_1$  励起する蛍光ラベラー分子の数は、

【 0 0 6 4 】

【数 9】

$$\frac{dn_1(t)}{dt} = a_2(S_0 \rightarrow S_1)n_0(t)$$

【 0 0 6 5 】

で与えられる。数 9 において、 $n_0(t)$  および  $n_1(t)$  は、レーザー光を照射してからの経過時間  $t$  における、 $S_0$  状態および  $S_1$  状態の単位体積あたりの蛍光ラベラー分子数である。ここで、物理量  $\sigma_{01}(2\lambda_1)$  を、下記数 10 のとおりに定義し、非共鳴二光子励起過程における吸収断面積とする。

【 0 0 6 6 】

【数 10】

$$\sigma_{01}(2\lambda_1) = a_2(S_0 \rightarrow S_1) / I(2\lambda_1)^2$$

【 0 0 6 7 】

単位体積あたりの蛍光ラベラー分子数を  $N_0$  とすると、数 9 の微分方程式は、

【 0 0 6 8 】

【数 11】

$$n_1(t) = N_0[1 - \exp\{-\sigma_{01}(2\lambda_1)I(2\lambda_1)^2 t\}]$$

【0069】

と解くことができる。

【0070】

ここで、下記の数12の関係を満たせば、大部分の蛍光ラベラー分子が $S_1$ 状態へ励起され、蛍光観察に必要な発光量を得ることができる。

【0071】

【数12】

$$\sigma_{01}(2\lambda_1)I(2\lambda_1)^2t \approx 1$$

【0072】

たとえば、Nd:YAGレーザー(1)からのレーザー光のパルス幅 $t$ を30 psec程度とすると、ローダミン6Gの非共鳴二光子励起過程での吸収断面積 $\sigma_{01}(2\lambda_1)$ は約 $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ sec/photon}$ 以下であることから、非共鳴二光子励起過程でのローダミン6Gの $S_0 \rightarrow S_1$ 励起に必要なレーザー光のフォトンフラックス $I(2\lambda_1)$ は約 $10^{30} \text{ photon/cm}^2 \text{ /sec}$ 以下となる。Nd:YAGレーザー(1)からの基本波(パルス幅 $t = 30 \text{ psec}$ 程度)をサブミクロンのサイズに集光したときの1パルス当たりのレーザー強度は $10 \text{ nJ/pulse}$ 以下となる。これは市販のNd:YAGレーザーでも十分に賄えるエネルギーである。したがって、非共鳴二光子励起過程によって、安価で手に入りやすいレーザーを用いることができるという利点もある。

【0073】

&lt;2&gt;イレース光

次に、イレース光について説明する。ローダミン6Gを通常の一光子励起過程で $S_1 \rightarrow S_2$ 励起させるには、約 $1.92 \text{ eV}$ の光子エネルギー $E_{12}$ が必要となる。またローダミン6Gは、約 $640 \text{ nm}$ 、つまり光子エネルギーに換算して $1.94 \text{ eV}$ 、から $S_1 \rightarrow S_2$ 吸収帯が始まる。したがって、Nd:YAGレーザー(1)からの基本波を波長変換して波長 $2\lambda_2 = \text{約} 1197 \text{ nm}$ ・光子エネルギー $E_{12}/2 = \text{約} 1.036 \text{ eV}$ とし、それをイレース光として用いることで、ロー

ダミン 6 G を非共鳴二光子励起過程で  $S_1 \rightarrow S_2$  励起させることができる。

【 0 0 7 4 】

このイレース光の Nd : YAG レーザー (1) からの生成は、たとえば特願平 1 0 - 9 7 9 2 4 と同様に、 $Ba(NO_3)_2$  結晶からなるラマンシフター (3) を用いて行うことができる。レーザー光を  $Ba(NO_3)_2$  結晶からなるラマンシフター (3) に通すと、波数にして  $1 0 4 5 \text{ cm}^{-1}$  づつ低エネルギー側にシフトしたストークス光が発生される。このストークス光は完全にコヒーレントであり、Nd : YAG レーザー (1) からの波長  $1 0 6 4 \text{ nm}$  の基本波を入射させると、波長  $1 1 9 7.4 \text{ nm}$  の一次のストークス光が発生される。この一次ストークス光で非共鳴二光子励起過程によりローダミン 6 G を  $S_1 \rightarrow S_2$  励起させると、ほぼ  $5 9 9 \text{ nm}$  (光子エネルギー :  $2.07 \text{ eV}$ ) のギャップのある準位間遷移が可能となる。したがって、ローダミン 6 G に対しては、この波長  $1 1 9 7 \text{ nm}$  の一次ストークス光をイレース光として用いることができる。

【 0 0 7 5 】

続いて、このような光子エネルギー  $E_{12}/2$  ・波長  $2\lambda_2$  を持つイレース光の必要強度、つまりローダミン 6 G を非共鳴二光子励起過程で  $S_1 \rightarrow S_2$  励起させるのに必要な強度、について説明する。

【 0 0 7 6 】

まず、ポンプ光・イレース光の照射および蛍光信号の測定は、たとえば図 1 5 に例示したタイミングで行うものとする。図 1 5 に例示したタイミングは、特願平 1 0 - 9 7 9 2 4 に開示されている時間分解計測法で用いられる照射・測定タイミングを例示したものである。この時間分解計測法は、ポンプ光およびイレース光のパルス幅  $t_p$ ,  $t_e$  が、蛍光ラベラー分子の蛍光寿命  $\tau$  より短い場合に特に有効な方法である。まず、パルス幅  $t_p$  のポンプ光で蛍光ラベラー分子を  $S_0 \rightarrow S_1$  励起させ、ポンプ光の照射終了後、即座にパルス幅  $t_e$  のイレース光を照射して蛍光ラベラー分子を  $S_1 \rightarrow S_2$  励起させる。このとき、本実施例では、前述したようにポンプ光およびイレース光の照射領域の一部重ね合わせを行い、空間的に観察不要な領域の蛍光を抑制する (図 6 参照)。そして、蛍光抑制領域  $A_1$  以外の蛍光領域  $A_0$  からの、イレース光の照射終了時から蛍光ラベラー分子の発光終了

時までの時間  $t_g$  の蛍光信号を検出するのである。

【0077】

このような照射・測定タイミングを前提とした場合、前記数 11 に従い、ポンプ光を時間  $t_p$  だけ照射したときに生成される  $S_1$  状態の分子数を  $n_1(t_p)$  とすると、時間  $t_e$  だけイレーズ光を照射したときの  $S_1$  状態の分子数は、下記の微分方程式で与えられる。

【0078】

【数 13】

$$\frac{dn_1(t)}{dt} = -[a_2(S_1 \rightarrow S_2) + a_2(f)]n_1(t)$$

【0079】

数 13 において、 $a_2(S_1 \rightarrow S_2)$  および  $a_2(f)$  は、各々、非共鳴二光子励起過程による  $S_1 \rightarrow S_2$  の遷移確率および誘導放出確率である。さらに、遷移確率および誘導放出確率に対して  $\sigma_{12}(2\lambda_2)$  および  $\sigma_f(2\lambda_2)$  という断面積を定義し、数 13 を解くと、

【0080】

【数 14】

$$n_1(t_e) = n_1(t_p) \exp[-\{\sigma_f(2\lambda_2) + \sigma_{12}(2\lambda_2)\} I(2\lambda_2)^2 t_e]$$

【0081】

が得られる。数 14 において、 $n_1(t_e)$  は、蛍光抑制領域  $A_1$  における単位体積内の  $S_1$  状態の蛍光ラベラー分子数である。蛍光ラベラー分子は、この  $n_1(t_e)$  に比例して蛍光抑制領域  $A_1$  から蛍光を発してしまう。そのため、超解像性を高めるには、蛍光抑制領域  $A_1$  の  $n_1(t_e)$  を極力小さくする必要がある。たとえば、蛍光領域  $A_0$  (= 観察領域) における蛍光ラベラー分子数  $n_1(t_e)$  の 10% 以下に押さえ込むことが好ましい。この場合、数 14 より、

【0082】

【数 15】

$$0.1 \geq \frac{n_1(t_e)}{n_1(t_p)} = \exp[-\{\sigma_f(2\lambda_{12}) + \sigma_f(2\lambda_2)\}I(2\lambda_2)^2 t_e]$$

【0083】

が得られ、さらに整理して、

【0084】

【数 16】

$$\{\sigma_f(2\lambda_{12}) + \sigma_f(2\lambda_2)\}I(2\lambda_2)^2 t_e \geq 2.3$$

【0085】

が得られる。ローダミン 6 G の場合、波長 599 nm では、 $\sigma_{12}(2\lambda_2) + \sigma_f(2\lambda_2)$  は  $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ sec/photon}$  のオーダーであり、イレース光のパルス幅  $t_e$  を 30 psec として数 16 より計算すると、イレース光に必要なフォトンフラックス  $I(2\lambda_2)$  も、ポンプ光同様に、 $10^{30} \text{ photon/cm}^2 \text{ /sec}$  程度となる。

【0086】

したがって、必要強度を有する光子エネルギー  $E_{01}/2$  ・波長  $2\lambda_1$  ポンプ光および光子エネルギー  $E_{12}/2$  ・波長  $2\lambda_2$  イレース光の発生は、一台の Nd : YAG レーザー (1) で可能となる。図 14 の例では、一台の Nd : YAG レーザー (1) からの基本波をハーフミラー (2) で分岐し、その透過光はポンプ光として用い、反射光は前述のようにラマンシフター (3) で波長変換してイレース光として用いるように構成されている。

【0087】

このようにして得られたイレース光は、ラマンシフター (3) の後側に設けられた反射ミラー (4) (5) によりビームコンバイナーとしてのダイクロイックミラー (7) へ入射される。反射ミラー (4) (5) として、表面に干渉膜がコーティングされているものを用いることで、ラマンシフター (3) により波長変換されなかった余計な Nd : YAG レーザー (1) の基本波をカットするように

してもよい。

#### 【0088】

##### <3>ポンプ光およびイレース光の重合せ

さて、本実施例では、ダイクロイックミラー（7）への光路上に、イレース光を中空ビーム化させるための位相板（6）が設けられている。この位相板（6）としては、たとえば図16に示したような構造を持つものを用いることができる。図16に例示した位相板（6）は、光軸を中心に位相を周回して $2\pi$ ずらす働きをする図8の構成を簡素化したものであり、光軸の周りを四等分割して、各領域が $\pi/2$ ずつずらし、光軸に対して軸対象となる点で位相が $\pi$ ずれるものとなっている。この位相板（6）を通過することで、イレース光は、中央部の強度がゼロで、且つ軸対象の強度分布を持つ中空ビームとなる。

#### 【0089】

そして、中空ビーム状のイレース光は、ダイクロイックミラー（7）でポンプ光と同じ光軸上を進行するようにコンバインされる。これにより、ポンプ光の一部に中空ビーム状イレース光が重なって、蛍光領域 $A_0$ および蛍光抑制領域 $A_1$ が生じるようになる。

#### 【0090】

したがって、本実施例においては、ポンプ光およびイレース光の照射領域を一部分重ね合わせる重ね手段は、位相板（6）、または位相板（6）とダイクロイックミラー（7）の組合せであると言える。

#### 【0091】

##### [B] 試料観察系

以上のように生成され、同軸に調整されたポンプ光とイレース光は、ハーフミラー（8）で反射され、試料観察系の対物レンズ（9）を介して試料（10）上に集光される。試料（10）は、前述したように、ローダミン6Gで染色された生体細胞である。この試料（10）は、三次元移動ステージ（11）上に搭載されており、集光面上での二次元移動と光軸に沿った一次元移動が可能となっている。三次元移動ステージ（11）としては、たとえば、インチワーム方式のPZT（圧電素子）で駆動され、数nmという高い位置分解能での位置決めが可能な

ものを用いることができる。

#### 【0092】

##### 〔C〕 蛍光検出系

蛍光検出系は、光電子倍增管（14）、接眼レンズ（13）、赤外線カットフィルター（12）という極めて単純な構成となっている。非共鳴二光子励起過程を用いたことにより、ポンプ光およびイレース光が蛍光信号に背景光として混入することも極めて効果的に抑制することができるが、さらに完全なるポンプ光およびイレース光の迷光除去を実現すべく、シャープカットフィルターの一つである赤外線カットフィルター（12）が蛍光光路上に挿脱自在に備えられていてもよい。

#### 【0093】

この赤外線カットフィルター（12）としては、たとえば波長  $1\ \mu\text{m}$  の光をカットできるものを用いて、ポンプ光およびイレース光の迷光を完全にカットできる。また、ローダミン6Gの蛍光帯域は、 $570\ \text{nm}$  前後であり、元々の光源の波長  $500\ \text{nm}$  とも離れているので、それほど高性能でないラフな作りの赤外線カットフィルターでも十分な迷光除去効果が得られる。

#### 【0094】

さらにまた、ポンプ光およびイレース光の波長  $2\lambda_1$ ,  $2\lambda_2$  は蛍光帯域に重なっていないので、従来の二重共鳴吸収顕微鏡のように波長が重複する蛍光信号を切り捨てる必要がなく、蛍光信号量の低下を伴わずに、すべての蛍光帯域の信号を無駄なく計測できる。さらには、検出器自体も、光電子倍增管という廉価で一般的な市販品ですむという利点がある。

#### 【0095】

たとえば特願平10-97924における二重共鳴吸収顕微鏡では、励起光と蛍光信号との分離のために、分光器やノッチフィルターなどの高価で精密な光学素子を多用していたり、またICCDカメラと分光器を組み合わせ、蛍光スペクトル全体を計測し、イレース光およびポンプ光を計算機上で取り除くという複雑な操作をも必要としていた。しかも、ICCDカメラと分光器のシステムは極めて高価であり、ユーザーの負担が大きすぎる。



## 【0096】

他方、計測法として、前述の図15に例示したような時間分解計測法を用いれば、万一励起光が混入してしまったとしても、蛍光計測時には完全にカットすることができ、 $S/N$ を格段に向上させることができる。

## 【0097】

以上のように、この発明の二重共鳴吸収顕微鏡によれば、簡単な構成で、極めて優れた $S/N$ の蛍光像を高い信号強度で得ることができる。

## 【0098】

## 〔実施例2〕

ここでは、図14に例示したこの発明の二重共鳴吸収顕微鏡における光軸方向の深さ分解能について説明する。

## 【0099】

まず最初に、前記数4を用いて、非共鳴2光子励起過程により、どのような蛍光強度分布が生じるかを定量的に論じる。まず、試料に空間的に均一に蛍光ラベラー分子が分布されていると仮定する。具体的な計算条件を表1に示す。

## 【0100】

【表1】

集光光学系開口数	0.75
蛍光ラベラー分子	ローダミン6G
分散状態	均一濃度染色
蛍光寿命	3 [nsec]
吸収断面積 $\sigma_{01}(2\lambda_1)$	$10^{-50} [\text{cm}^4 \text{sec/photon}] (1064\text{nm})$
吸収断面積 $\sigma_{12}(2\lambda_2)$	$10^{-50} [\text{cm}^4 \text{sec/photon}] (1197\text{nm})$
ポンプ光波長	1064 [nm]
イレーズ光波長	1197 [nm]
ポンプ光・イレーズ光 パルス幅	30 [psec]
ポンプ光・イレーズ光 インターバル	なし
蛍光測定法	時間分解計測法
1光子 $S_0 \rightarrow S_1$ 吸収断面積 $\sigma_{01}(\lambda_1)$	$4 \times 10^{-16} [\text{cm}^2] (532\text{nm})$
1光子 $S_1 \rightarrow S_2$ 吸収断面積 $\sigma_{12}(\lambda_2)$	$0.5 \times 10^{-16} [\text{cm}^2] (599\text{nm})$
1光子 $S_2 \rightarrow S_1$ 誘導放出断面積 $\sigma_{21}(\lambda_2)$	$0.5 \times 10^{-16} [\text{cm}^2] (599\text{nm})$

## 【0101】

図17および図18は、各々、ポンプ光励起による試料からの焦平面における横方向（X軸方向）の蛍光強度分布および焦点を原点とした光軸方向（Z軸方向）の蛍光強度分布を例示したものであり、各図中、実線曲線は非共鳴二光子励起過程を用いた場合の分布、点線曲線は一光子励起過程を用いた場合の分布を示している。また各蛍光強度分布は、前記数5および数6を用いて算出した。

## 【0102】

これら図17および図18によれば、一光子励起過程の場合における蛍光強度分布は、ポンプ光の励起波長が短いので、非共鳴二光子励起過程のそれと比較すると、光軸近傍の蛍光強度に集中している。これに対し、非共鳴二光子励起過程の場合における蛍光強度分布は、一光子励起過程のものと比較すると、急速に収束し、焦点から遠方では強度がゼロであることが分かる。すなわち、非共鳴二光子励起過程では励起したローダミン6G分子は焦点近傍に局在しており、試料三次元内の特定の場所のみから蛍光を発していることが分かる。これにより、二重共鳴吸収顕微鏡における三次元空間分解能が可能となっている。

## 【0103】

また、図19は、一光子励起過程および非共鳴二光子励起過程の場合の、イレース光による焦平面における $S_1 \rightarrow S_2$ 励起確率を例示したものである。イレース光が中空ビーム化されて一次のベッセルビームとなっていると仮定すると、 $S_1 \rightarrow S_2$ 励起確率は下記の数17で計算できる。このとき数17において $m=1$ として計算する。そして、この $S_1 \rightarrow S_2$ 励起確率は、一光子励起過程の場合ではレーザー光強度の1乗に比例し、二光子励起過程の場合ではレーザー光強度の2乗に比例して、数5および数6に従うこととなる。

## 【0104】

## 【数17】

$$I(x, y, z) = \iint_{NA} e^{-\frac{z}{2f^2}(\xi^2 + \zeta^2)} e^{-im\phi - i\frac{2\pi}{\lambda}(x\xi + y\zeta\eta)} d\xi d\zeta$$

## 【0105】

計算結果によれば、図19に例示した空間分布に従って蛍光抑制がなされることがわかる。イレース光が中空ビーム化されていると仮定しているので、一光子励起過程と非共鳴二光子励起過程のいずれの場合も、その形状は顕微鏡の光軸方向の深さ分解能には影響を与えない。しかし、光軸と直交する平面のプロファイルでは、非共鳴二光子励起過程の方がややブロードして中空領域が広いので、平面分解能に関して影響を与える。

## 【0106】

次に、数14により表される蛍光抑制特性曲線と図17, 18, 19に例示したビームプロファイルを用いて、蛍光抑制効果が発現した時の蛍光強度分布を求める。図20および図21は、各々、非共鳴二光子励起過程を用いた場合における、焦点近傍の焦点面内の横方向(X軸方向)および光軸方向(Z軸方向)の蛍光強度分布を例示したものである。計算には数17を用いた。試料がローダミン6Gにより染色されているとして、イレース光は波長1197nm、フロンフラックス  $10^{32}$  photons/cm<sup>2</sup>/secを有するものとして計算した。

## 【0107】

たとえば、パルス幅30psecのレーザー光を想定し、NA=0.75の無収差レンズで集光すると、スペックは大体10μJ/pulseであり、光強度としては極めて弱く、市販のレーザーでも十分賄える現実的な値である。図20から明らかなように、非共鳴二光子励起過程を用いたこの発明の二重共鳴吸収顕微鏡では、ポンプ光の波長1064nmを単位として、約λ/20の蛍光サイズが実現していることが分かる。言い換えると、赤外光を利用して50nmの空間分解能が得られることを示している。一方、図21は光軸方向の深さ分解能を示しているが、約4λの深さ分解能を得ている。

## 【0108】

また、図22は、図20と図21で計算した蛍光強度分布を空間周波数領域にフーリエ変換した場合の空間分解能を例示したものである。この図22から明らかなように、この発明によって、従来の二重共鳴吸収顕微鏡では得られなかった光軸方向の深さ分解能があることが分かる。すなわち、光軸であるk<sub>1z</sub>方向に

周波数成分を持っていることに対応する。

【0 1 0 9】

以上より、図 1 4 に例示したこの発明の二重共鳴吸収顕微鏡は、ポンプ光およびイレース光の空間的重合せによる横方向の超解像性ととも、非共鳴二光子励起過程による縦方向（深さ方向）の空間分解能をも獲得できることがわかる。なお、位相板（6）をイレース光の光路に対して挿脱自在なものとしておくことで、蛍光信号の測定において深さ分解能のみを求める場合には位相板（6）を外し、平面分解能をも同時に求める場合には位相板（6）を挿入するようにして、いずれかを選択自在とすることもできる。

【0 1 1 0】

〔実施例 3〕

さて、上述した図 1 4 の二重共鳴吸収顕微鏡は、 $S_0 \rightarrow S_1$  励起（ポンプ光）および  $S_1 \rightarrow S_2$  励起（イレース光）の両方に非共鳴二光子励起過程を用いた場合のものであるが、この発明では、 $S_0 \rightarrow S_1$  励起または  $S_1 \rightarrow S_2$  励起のいずれか一方に非共鳴二光子励起過程を用いることも可能である。

【0 1 1 1】

図 2 3 は、 $S_0 \rightarrow S_1$  励起には一光子励起過程を、 $S_1 \rightarrow S_2$  励起には非共鳴二光子励起過程を用いた場合のこの発明の二重共鳴吸収顕微鏡を例示したものである。この図 2 3 の二重共鳴吸収顕微鏡は、図 1 4 と同様に、レーザー走査型蛍光顕微鏡を構成しており、ポンプ光およびイレース光の照射領域の一部重合せをも行い得る態様であり、非共鳴多光子励起過程は非共鳴二光子励起過程を用いるとし、試料（1 1 4）は、蛍光ラベラー分子としてのローダミン 6 G により染色した生体試料であるとする。

【0 1 1 2】

したがって、ポンプ光は、通常の一光子励起過程での  $S_0 \rightarrow S_1$  励起に必要な光子エネルギー  $E_{01} = \text{約 } 2.33 \text{ eV}$ ・波長  $\lambda_1 = \text{約 } 532 \text{ nm}$  となり、イレース光は非共鳴二光子励起過程での  $S_1 \rightarrow S_2$  励起に必要な光子エネルギー  $E_{12}/2 = \text{約 } 1.036 \text{ eV}$ ・波長  $2\lambda_2 = \text{約 } 1197 \text{ nm}$  となる。

【0 1 1 3】

まず、一光子励起過程によるポンプ光は、ハーフミラー（102）により分光されたNd:YAGレーザー（101）からの波長1064 nm・パルス幅30 psecの基本波がKTP結晶（103）を通過することで2倍波（波長532 nm）に変換されて、生成される。このポンプ光は、テレスコープ（104）で拡大され、反射ミラー（105）によりビームコンバイナーとしてのダイクロイックミラー（111）へ入射される。

## 【0114】

他方、非共鳴二光子励起過程によるイレース光は、ハーフミラー（102）により分光された他方の基本波がラマンシフター（106）を通過することで波長1197.4 nmの一次ストークス光が発生して、生成される。ラマンシフター（106）は、図14の場合と同様、 $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 結晶からなり、結晶光子の共鳴波数 $1047\text{ cm}^{-1}$ の整数倍で、長波長側（光子エネルギーで言えば低エネルギー側）の入射光を波長変換するものである。このイレース光は、テレスコープ（107）で拡大された後、位相板（108）で中空ビーム化される。

## 【0115】

図24（b）は、波長1197 nm用の位相板（108）の一例を示したものである。図24（b）に例示した位相板（108）は、図24（a）にその断面を例示したように、ガラス基板上の領域を4分割して、それぞれの領域にフッ化マグネシウムを蒸着したものであり、各領域においてフッ化マグネシウムの膜厚を変化させて、波長1197 nmに対して光軸に点対称な位置の領域を通過したイレース光の位相が互いに $\pi$ だけずれるようにしてある。結果として、光軸上で強度がゼロとなる理想的な中空ビーム形状を持つイレース光が生成できる。なお、位相板（108）は挿脱自在とされ、イレース光の中空ビーム化は任意に選択可能となっていることが好ましい。ここでは、横方向超解像性を付与すべく、イレース光は中空ビーム化されて、ポンプ光の一部分にのみ中空ビームイレース光が重ね合わされるとして説明する。

## 【0116】

中空ビーム化されたイレース光は、反射ミラー（109）によりダイクロイックミラー（111）へ入射される。反射ミラー（109）とダイクロイックミラ

ー (1 1 1) の間の光路にはノッチフィルター (1 1 0) が挿入されており、イレーヌ光がこのノッチフィルター (1 1 0) を通過することで、ラマンシフター (1 0 6) で変換できなかった Nd : YAG レーザー (1 0 1) の基本波である波長 1 0 6 4 nm 光をカットして、完全に波長 1 1 9 7 nm のイレーヌ光のみとされる。

## 【 0 1 1 7 】

そして、光子エネルギー  $E_{01}$  = 約 2. 3 3 e V ・ 波長  $\lambda_1$  = 約 5 3 2 nm のポンプ光および光子エネルギー  $E_{12}/2$  = 約 1. 0 3 6 e V ・ 波長  $2\lambda_2$  = 約 1 1 9 7 nm のイレーヌ光は、ダイクロイックミラー (1 1 1) によって同軸光とされ、試料観察光学系に導かれる。

## 【 0 1 1 8 】

なお、図 2 3 では KTP 結晶 (1 0 3) はハーフミラー (1 0 2) のポンプ光光路側に設けられているが、ハーフミラー (1 0 2) の入射側に設けられていてもイレーヌ光は生成できる。すなわち、KTP 結晶 (1 0 3) を通過しても 2 倍波に変換されない基本波があるため、レーザー強度が十分あれば、ラマンシフター (1 0 6) へ未変換基本波が入射されて、 $S_1 \rightarrow S_2$  励起に必要な強度のイレーヌ光を生成することができる。

## 【 0 1 1 9 】

同軸光とされたポンプ光および中空ビームイレーヌ光は、ハーフミラー (1 1 2) で試料観察光学系の光軸上に乗り、対物レンズ (1 1 3) により試料面上に集光される。

## 【 0 1 2 0 】

本実施例では、試料 (1 1 4) の後側にも観察用の顕微鏡光学系が設けられており、試料 (1 1 4) の透過光は、透過光用レンズ (1 1 6 a) (1 1 6 b) を介して CCD カメラ (1 1 9) により観察される。

## 【 0 1 2 1 】

他方、試料面から発光した蛍光は、対物レンズ (1 1 3) およびハーフミラー (1 1 2) を通過して、ノッチフィルター (1 1 8) を通過する。このノッチフィルター (1 1 8) は、波長  $\lambda_1$  5 3 2 nm のポンプ光の迷光をカットする。イ

レース光は、波長  $2\lambda_2$  であるので蛍光信号に混入しないため、ノッチフィルターなどを用いて蛍光信号から除去する必要はない。

#### 【0122】

そして、ポンプ光の迷光が除去された蛍光は、結像レンズ（119）により共焦点位置に置かれたピンホール（120）径上に集光され、ピンホール（123）を通過して分光器（121）で波長分光された後、その蛍光スペクトルがICCDカメラ（122）で直接撮像される。

#### 【0123】

蛍光信号は、ポンプ光および中空ビームイレース光の重畳照射によって優れた平面解像を持つとともに、イレース光についての非共鳴二光子励起過程によって優れた深さ解像を持つものとなる。もちろん、ポンプ光およびイレース光ともに背景光として蛍光信号に混入しないので、S/Nも極めて高いものとなる。

#### 【0124】

このような蛍光信号の三次元画像化は、たとえばコンピュータ（図示していない）を用いて以下のように行うことができる。

#### 【0125】

試料が搭載されている三次元移動ステージ（115）をポンプ光およびイレースの光軸に対して直交する面で二次元走査を行いつつ、光軸方向にも一次元移動させる。各走査ポイントからの蛍光信号がICCDカメラ（122）からコンピュータに入力される。各蛍光信号データをグラフィック化すれば、試料（114）の三次元蛍光像が得られる。より具体的には、コンピュータは、基本光源としてのNd:YAGレーザー（101）のコントローラー（図示していない）を駆動して、レーザー発振のタイミングを制御すると同時に、三次元移動ステージ（115）を制御して、レーザー発振のタイミングとの同期により試料（114）を三次元走査する。また同様に、レーザー発振との同期によりICCDカメラ（122）から試料（114）の蛍光スペクトル信号のデータをコンピュータへ入力する。

#### 【0126】

ここで、ポンプ光およびイレース光のパルス幅30psecは、ローダミン6G分

子の蛍光寿命 3 nsec よりも遙かに短いため、前述した時間分解計測法を利用して ICCD カメラ (122) の計測時間ゲートや Nd : YAG レーザー (101) の光路長を調整することができる。たとえば前述の図 15 に例示したタイミングでいうと、 $t_p$  がポンプ光のパルス幅 30 psec、 $t_e$  がイレース光のパルス幅 30 psec、 $t_g$  が ICCD カメラ (122) の計測ゲートとなる。これにより、万一、極少量のポンプやイレース光が蛍光信号に混入したとしても、蛍光計測時には ICCD カメラ (122) に混入しないように制御でき、さらなる S/N 向上が実現される。

## 【0127】

この時間分解計測法を用いる場合には、ノッチフィルター (118) を外して構成の簡素化を図ってもよい。もちろん、光学系構成よりも S/N を重視する場合には、ノッチフィルター (118) を残したまま、時間分解計測法を併用することができる。

## 【0128】

なお、図 23 の例では、三次元移動ステージ (115) のメカニカルスキャンを前提にしているが、もちろん、ハーフミラー (111) を揺動するガルバノミラーにより、レーザービーム自体を走査することも可能である。

## 【0129】

ところで、以上の本実施例の二重共鳴吸収顕微鏡は  $S_0 \rightarrow S_1$  励起に一光子励起過程を、 $S_1 \rightarrow S_2$  励起に非共鳴二光子励起過程を用いた場合の構成となっているが、その逆に、 $S_0 \rightarrow S_1$  励起には非共鳴二光子励起過程を、 $S_1 \rightarrow S_2$  励起には一光子励起過程を用いた構成として、上述と同様な効果を実現することももちろん可能である。この場合、ポンプ光については、ポンプ光光路上の KTP 結晶 (103) を外して、Nd : YAG レーザー (101) の基本波 1064 nm ( $= 2\lambda_1$ ) をそのままポンプ光として利用する。イレース光については、KTP 結晶 (103) をラマンシフター (106) の入射側のイレース光光路上に挿入して、KTP 結晶 (103) により基本波 1064 nm を 2 倍波 532 nm に変換させ、ラマンシフター (106) により 2 倍波 532 nm から 599 nm ( $= \lambda_2$ ) の二次ストークス光を生成させて、それをイレース光として利用する。また、



位相板（108）としては、図24（c）に例示したように波長599nmに対応させたものを用い、599nmのイレース光は理想的な中空ビームとなる。ノッチフィルター（118）としては、599nmのイレース光の迷光をカットできるものを用いる。

#### 【0130】

この発明は以上の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。たとえば、以上の実施例は蛍光ラベラー分子の一代表例としてローダミン6Gを用いて試料を染色した場合のものであるが、その他の蛍光ラベラー分子を用いても、同様に優れたS/N向上、三次元空間分解能を実現できる。蛍光ラベラー分子に合わせて、光学的非線形効果を用いた波長可変のOPA、OPO、OPGレーザーシステムなどを用いて、然るべき光子エネルギー・波長のポンプ光およびイレース光を発生させれば良い。

#### 【0131】

##### 【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、励起光の蛍光信号への混入を抑制して、極めて優れたS/Nを達成することができ、且つ、優れた三次元空間分解能をも実現できる、新しい二重共鳴吸収顕微鏡が提供される。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

基底状態の試料分子の電子配置を例示した図である。

##### 【図2】

S<sub>1</sub>状態に励起された試料分子の電子配置を例示した図である。

##### 【図3】

S<sub>2</sub>状態に励起された試料分子の電子配置を例示した図である。

##### 【図4】

脱励起した試料分子の電子配置を例示した図である。

##### 【図5】

二重共鳴吸収過程を例示した概念図である。

##### 【図6】

二重共鳴吸収過程を空間的に例示した概念図である。

【図 7】

ポンプ光およびイレース光の一部重合せおよびそれによる蛍光抑制を例示した概念図である。

【図 8】

中空ビーム化用の位相板について例示した概念図である。

【図 9】

ローダミン 6 G の吸収特性（実線）および蛍光特性（点線）を例示した図である。

【図 1 0】

非共鳴二光子励起過程を例示した概念図である。

【図 1 1】

この出願の発明における非共鳴二光子励起過程を用いた二重共鳴吸収過程を例示した概念図である。

【図 1 2】

励起光と吸収帯域および蛍光帯域との関係を例示した図である。

【図 1 3】

(a) (b) は、各々、一光子励起過程および非共鳴二光子励起過程の場合における空間分解能を例示した概念図である。

【図 1 4】

この出願の発明の二重共鳴吸収顕微鏡の一実施例を示した概略図である。

【図 1 5】

時間分解計測法における照射・測定タイミングの一例を示した図である。

【図 1 6】

中空ビーム化用の位相板の一例を示した概略図である。

【図 1 7】

一光子励起過程（点線）および非共鳴二光子励起過程（実線）を用いた場合における、焦平面内の X 軸方向の蛍光強度分布を例示した図である。

【図 1 8】

一光子励起過程（点線）および非共鳴二光子励起過程（実線）を用いた場合における、焦点を原点としたZ軸方向の蛍光強度分布を例示した図である。

【図 1 9】

一光子励起過程（点線）および非共鳴二光子励起過程（実線）を用いた場合における、焦平面内のX軸方向のS 1 → S 2 励起確率を例示した図である。

【図 2 0】

非共鳴二光子励起過程を用いた場合における焦平面内のX軸方向の蛍光強度分布を例示した図である。

【図 2 1】

非共鳴 2 光子励起過程を用いた場合におけるZ軸方向の蛍光強度分布を例示した図である。

【図 2 2】

非共鳴 2 光子励起過程を用いた場合における空間分解能を例示した概念図である。

【図 2 3】

この出願の発明の二重共鳴吸収顕微鏡の別の一実施例を示した概略図である。

【図 2 4】

(a) (b) (c) は、各々、位相板の概略断面、波長 1 1 9 7 . 4 n m 光用の位相板の概略平面、波長 5 9 9 n m 光用の位相板の概略平面を例示した図である。

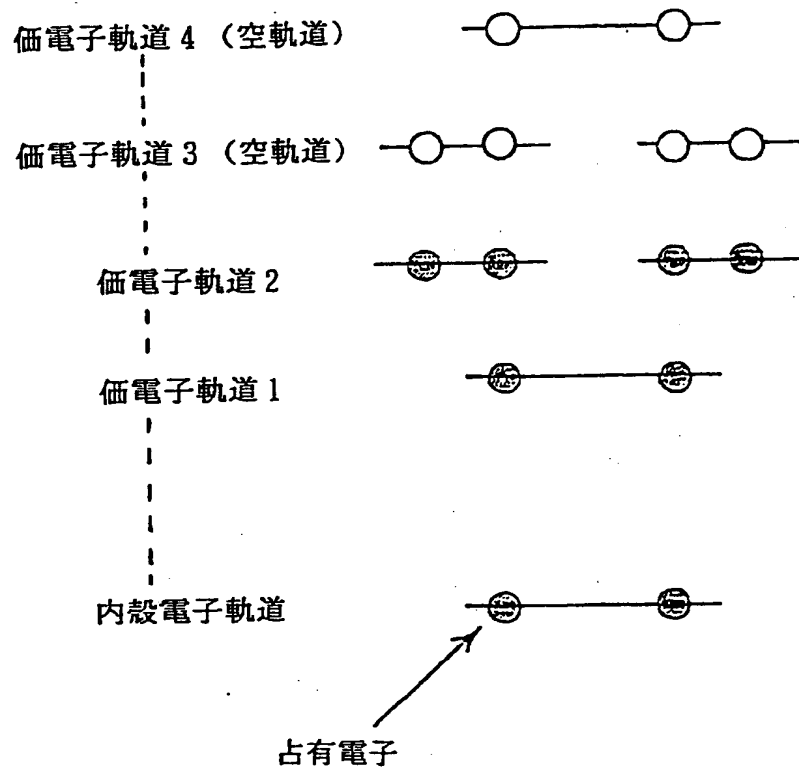
【符号の説明】

- 1 Nd : Y A G レーザー
- 2、8 ハーフミラー
- 3 ラマンシフター
- 4、5 反射ミラー
- 6 位相板
- 7 ダイクロイックミラー
- 9 対物レンズ
- 1 0 試料

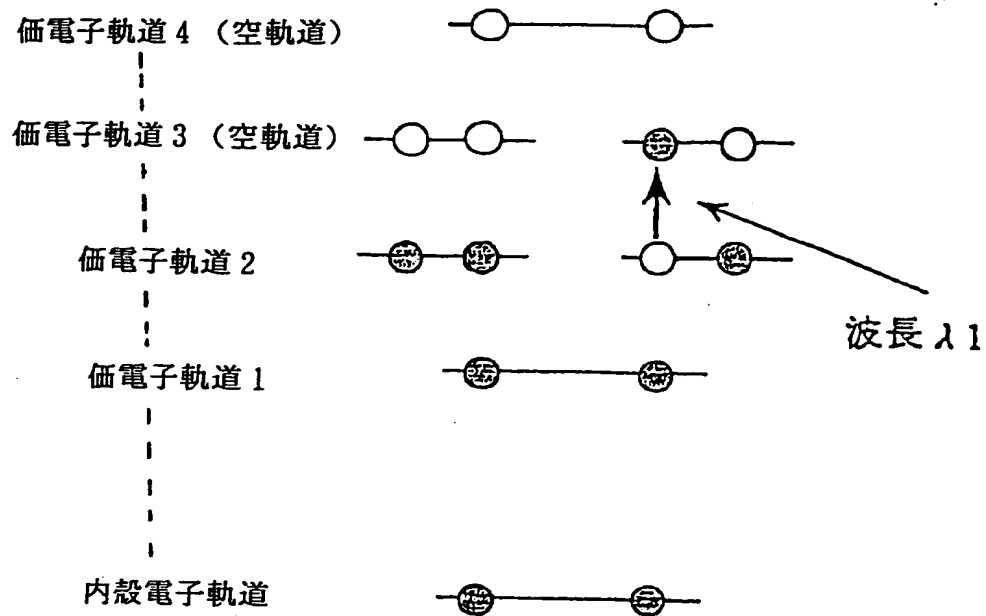
- 1 1 三次元移動ステージ
- 1 2 赤外線カットフィルター
- 1 3 接眼レンズ
- 1 4 光電子倍增管
- 1 0 1 N d : Y A G レーザー
- 1 0 2、1 1 2 ハーフミラー
- 1 0 3 K T P 結晶
- 1 0 4、1 0 7 テレスコープ
- 1 0 5、1 0 9 反射ミラー
- 1 0 6 ラマンシフター
- 1 0 8 位相板
- 1 1 0、1 1 8 ノッチフィルター
- 1 1 1 ダイクロイックミラー
- 1 1 3 対物レンズ
- 1 1 4 試料
- 1 1 5 三次元移動ステージ
- 1 1 6 a, 1 1 6 b 透過光用レンズ
- 1 1 7 C C D カメラ
- 1 1 9 結像レンズ
- 1 2 0 ピンホール
- 1 2 1 分光器
- 1 2 2 I C C D カメラ

【書類名】 図面

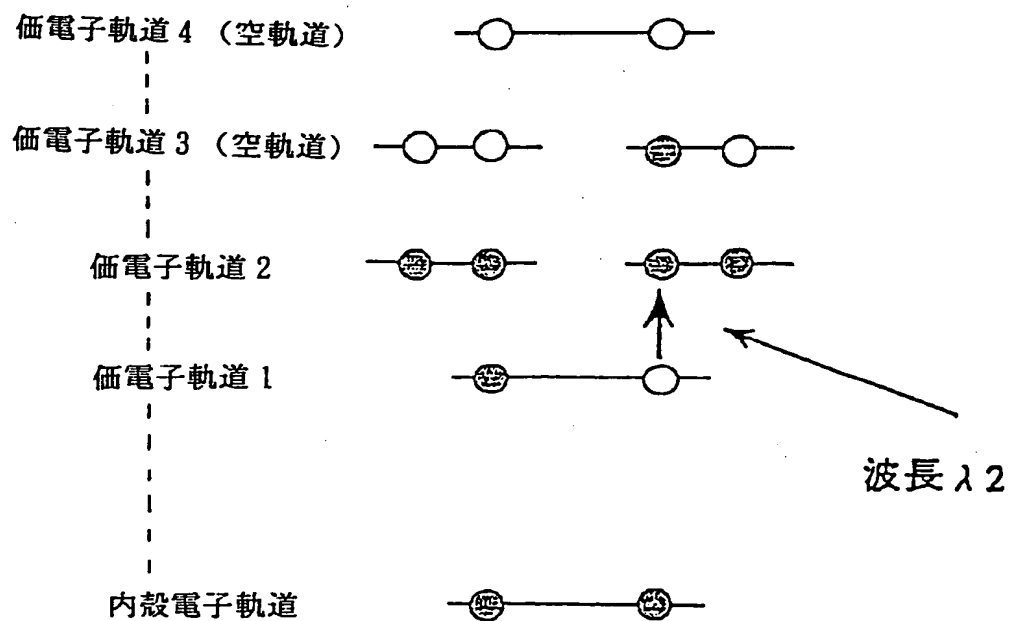
【図 1】



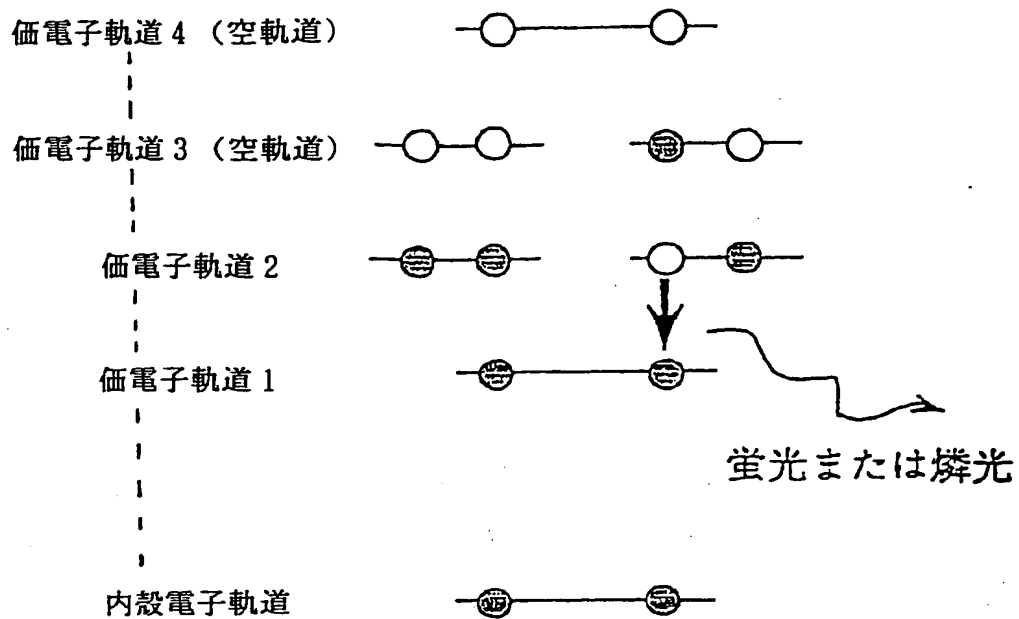
【図 2】



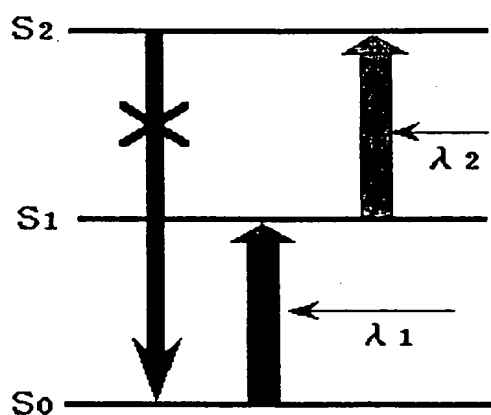
【図 3】



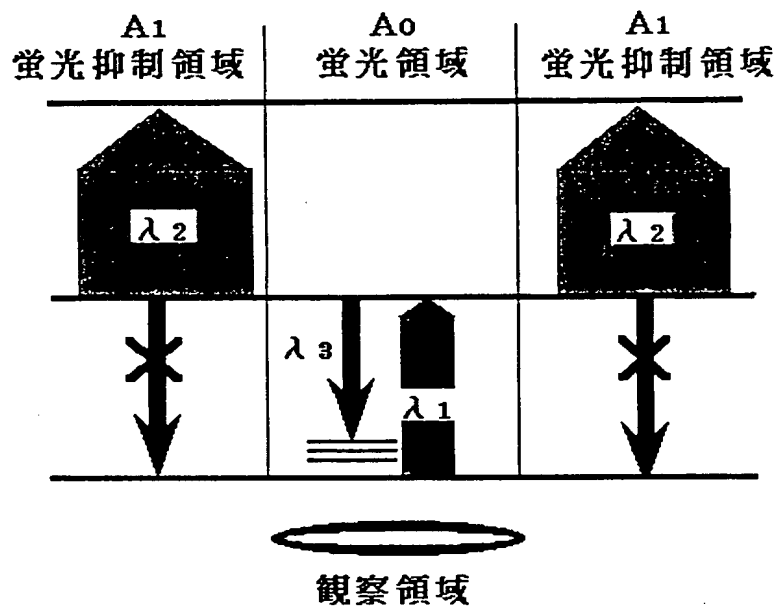
【図 4】



【図 5】

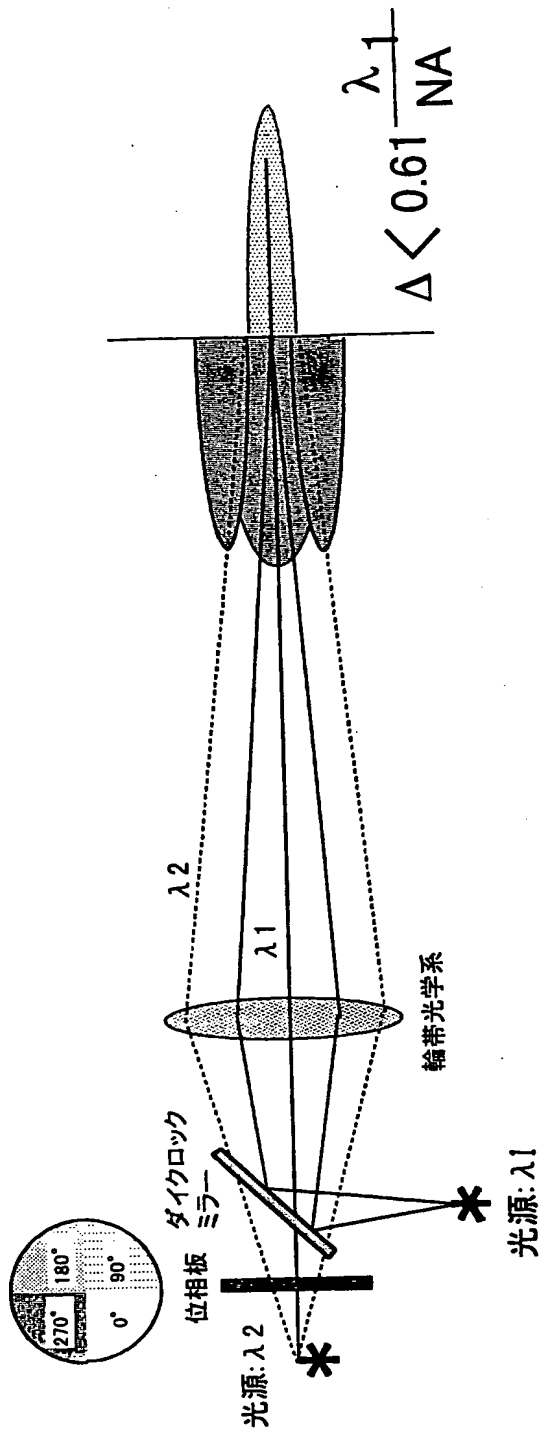


【図 6】

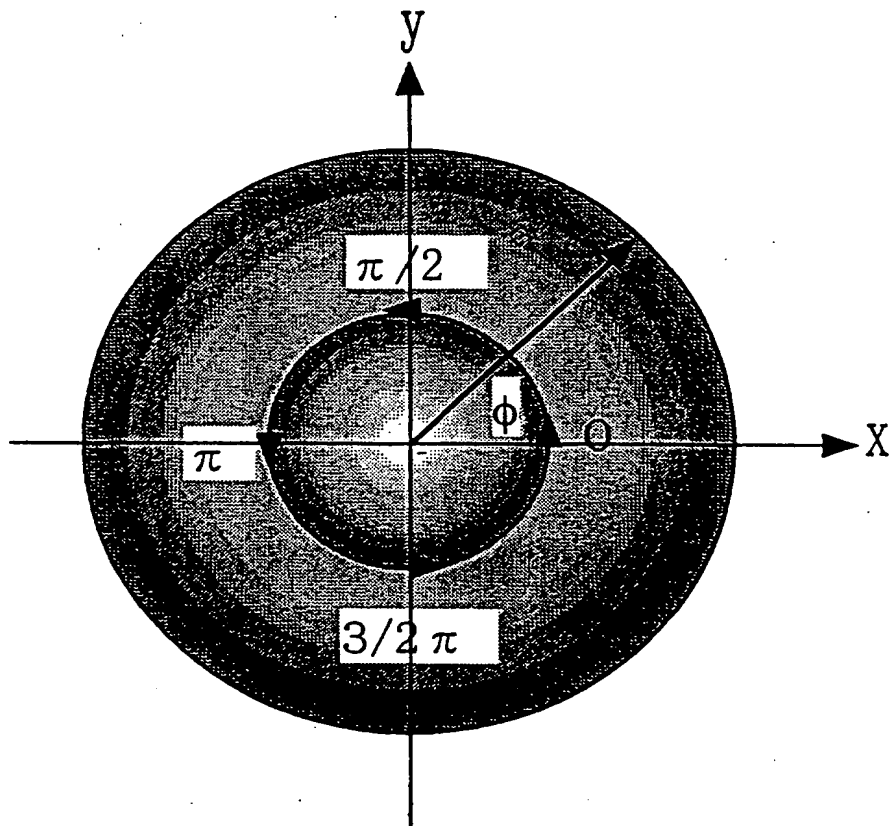




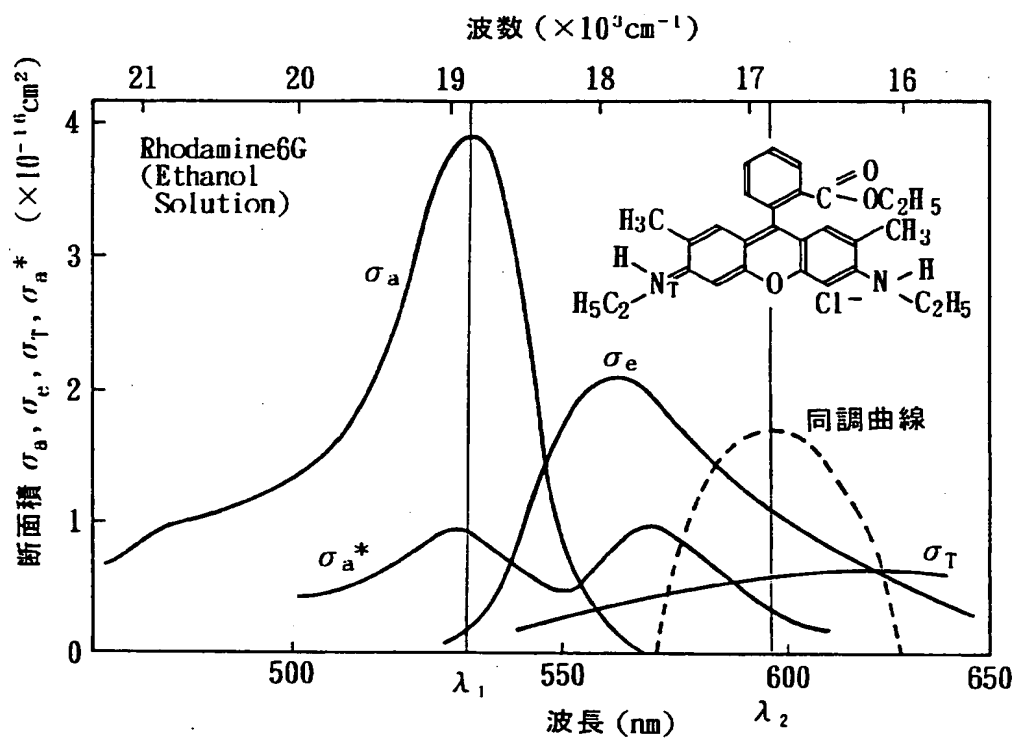
【図 7】



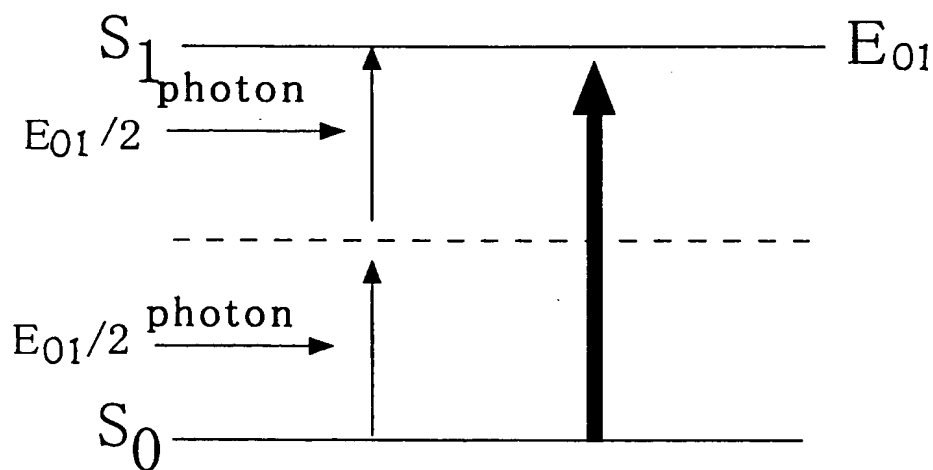
【図 8】



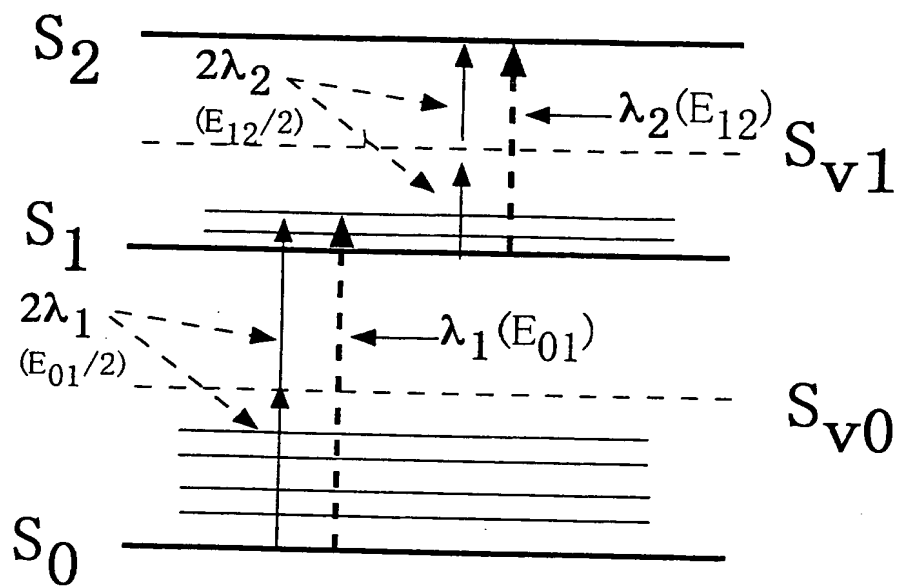
【図 9】



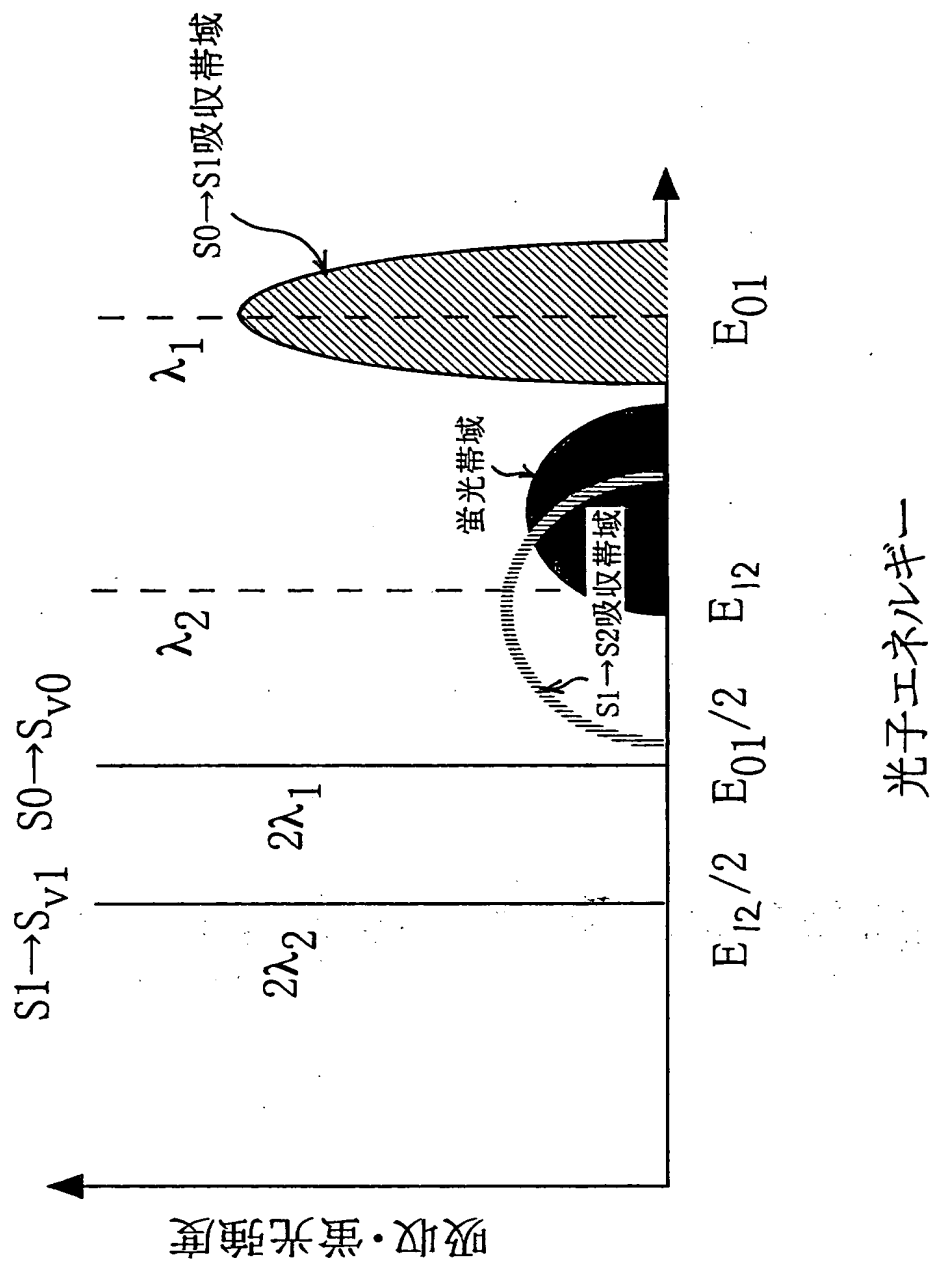
【図 10】



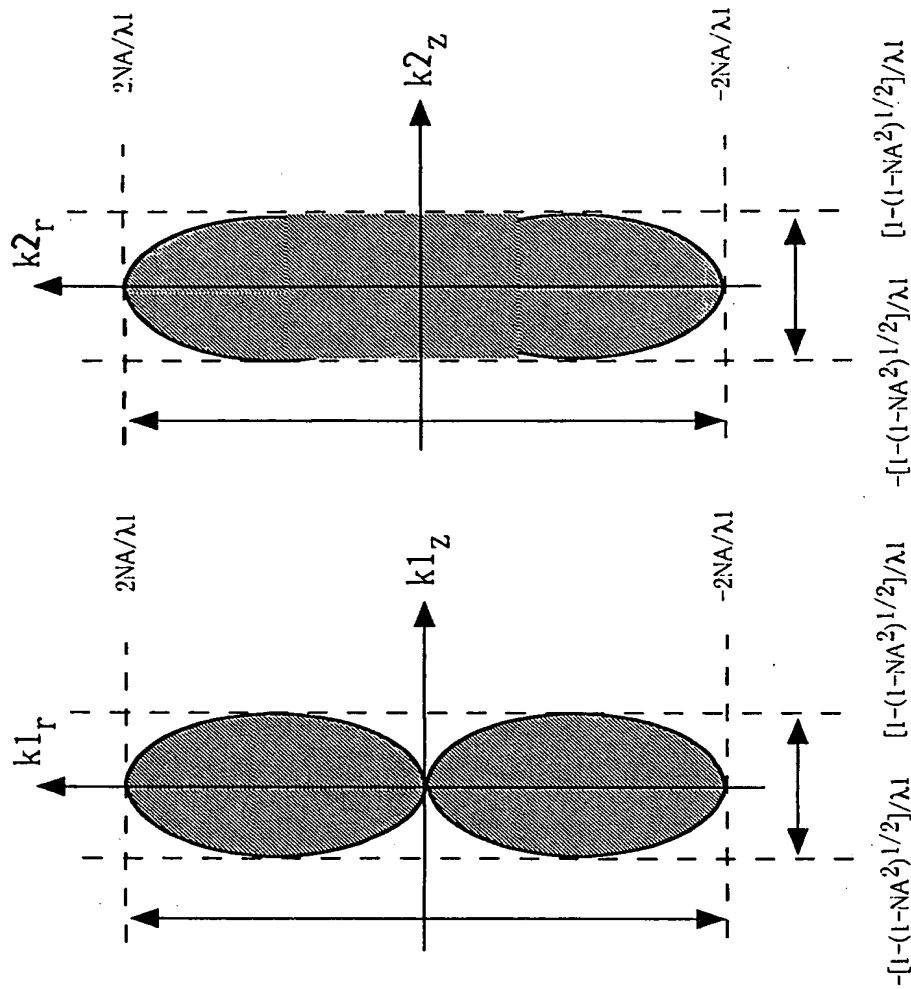
【図 11】



【図 12】



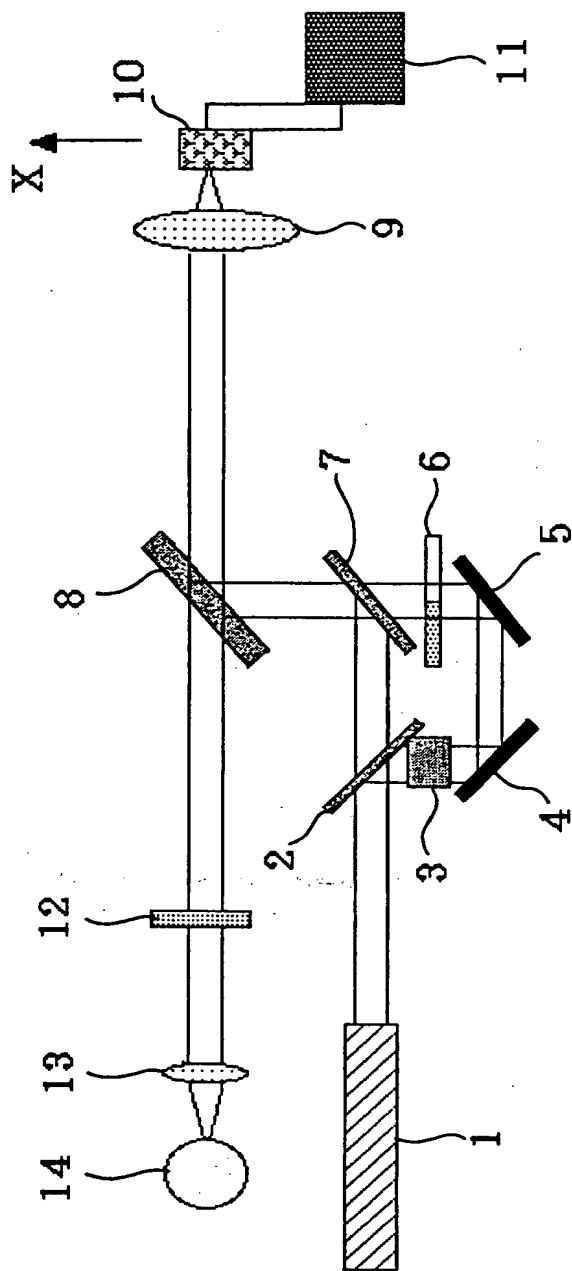
【圖 13】



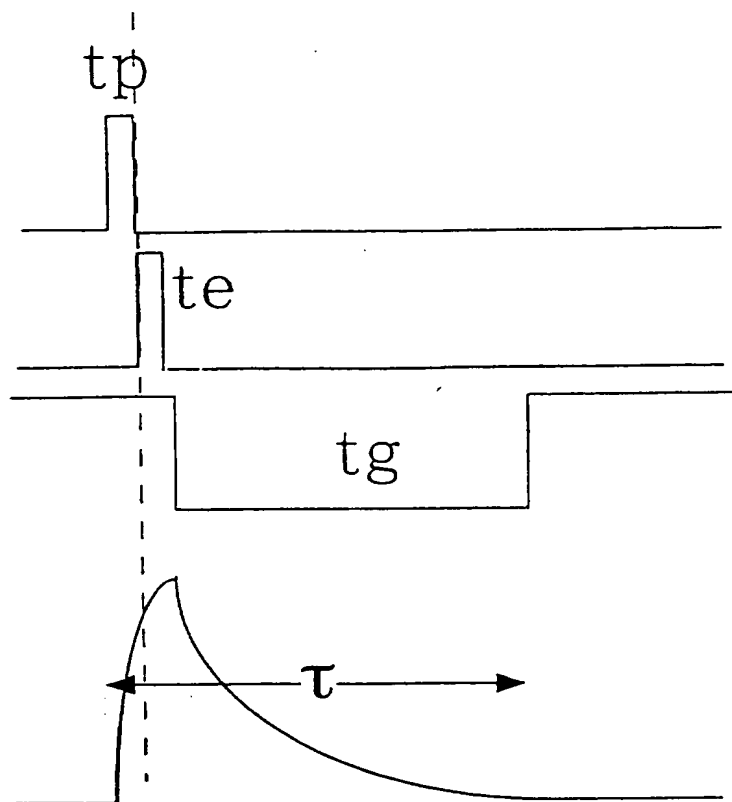
非共鳴2光子励起過程

1光子励起過程

【図 14】

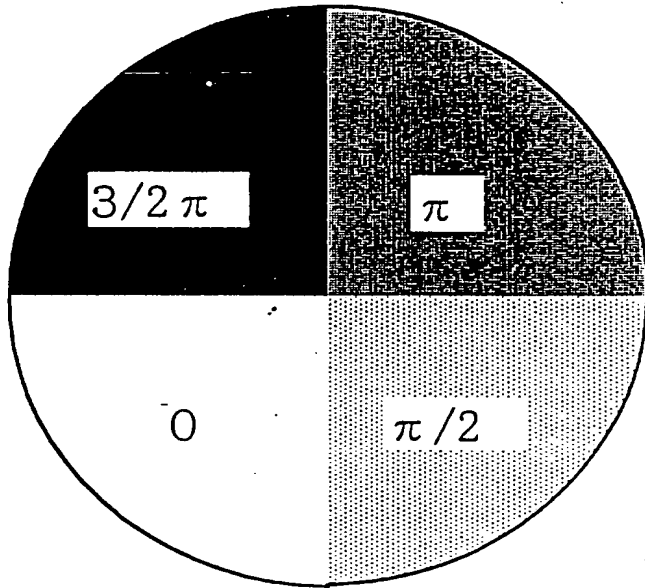


【図15】

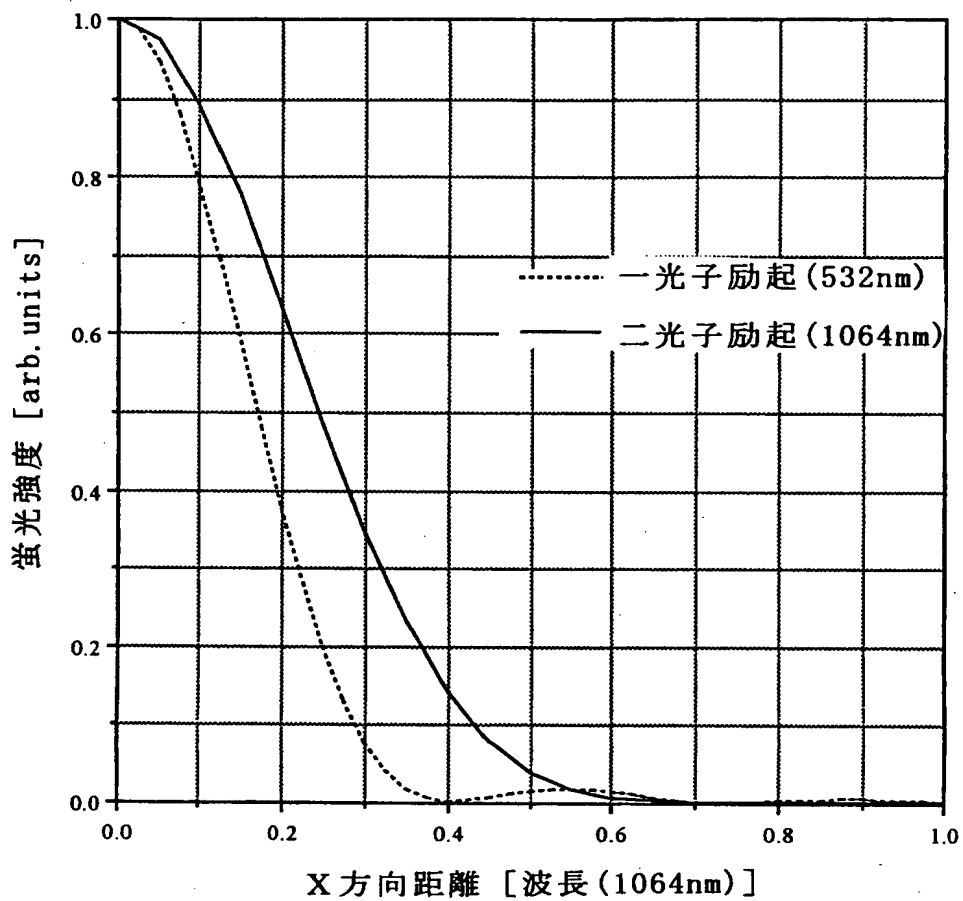




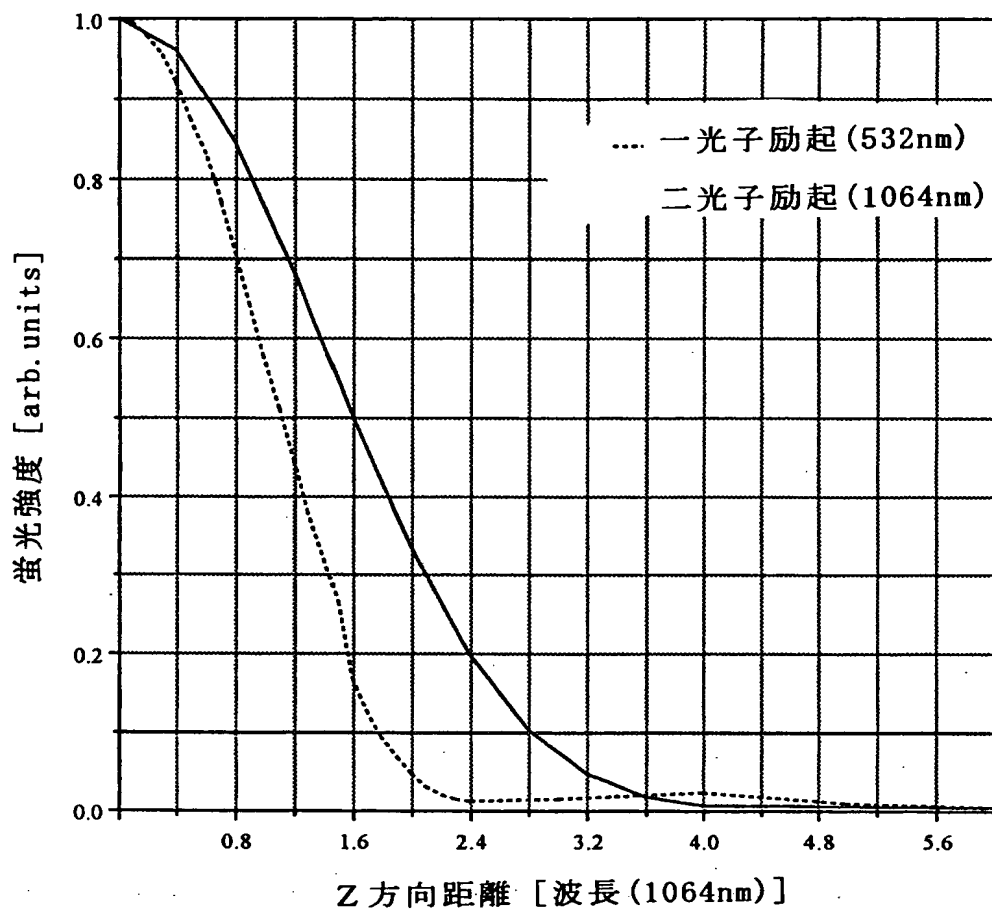
【図16】



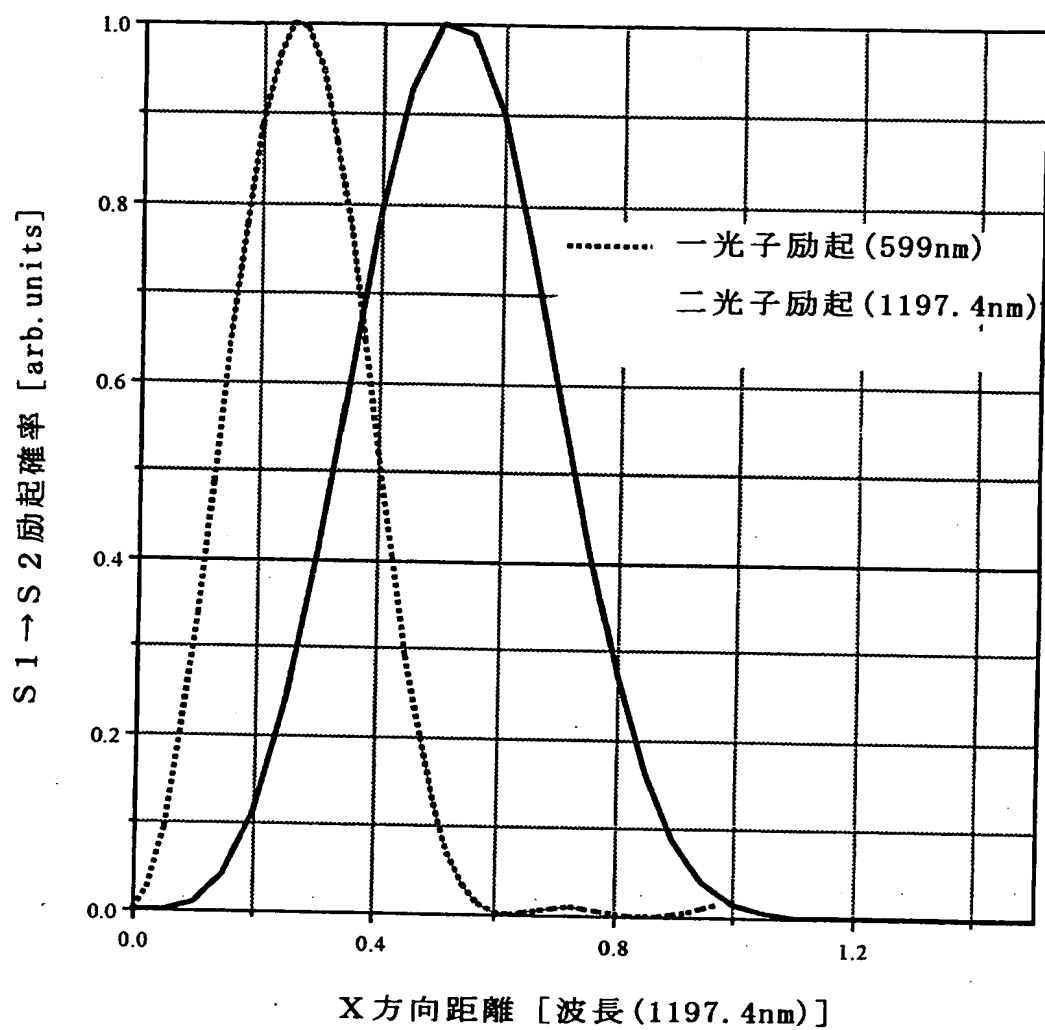
【図17】



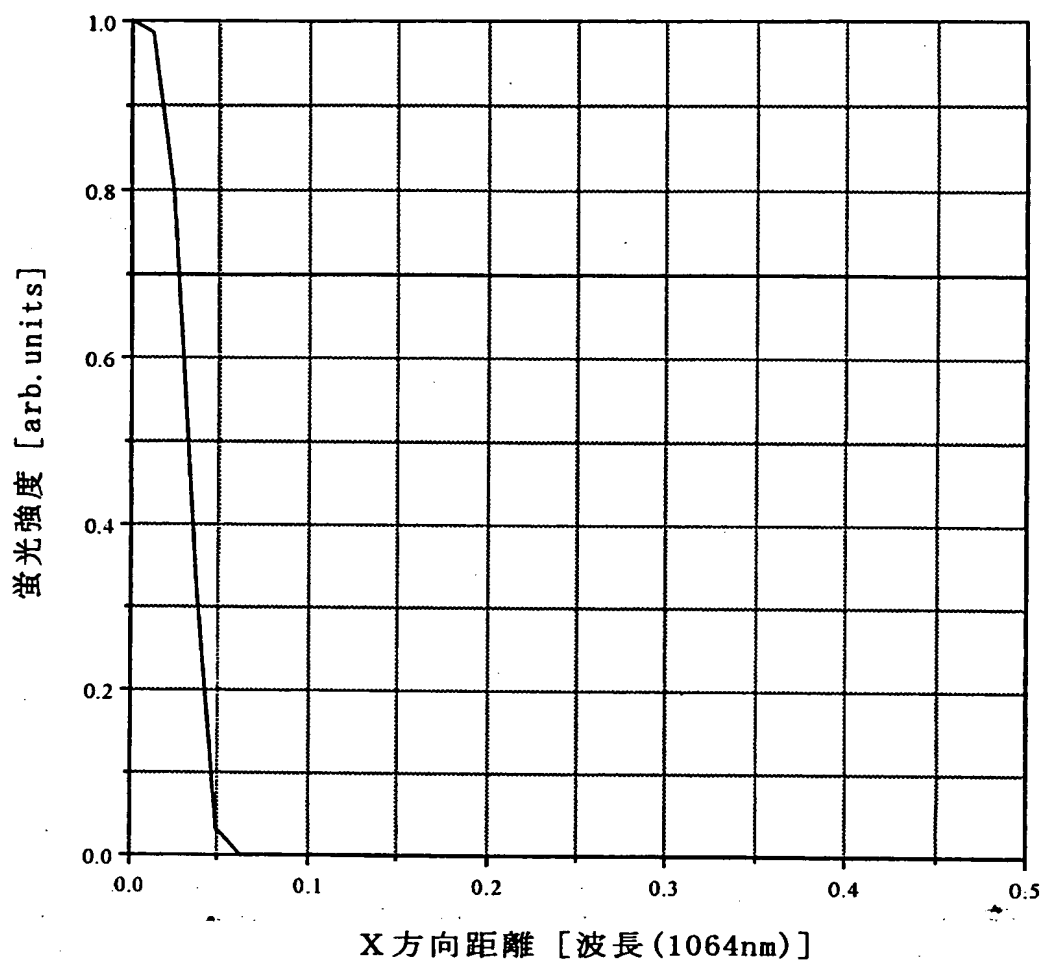
【図18】



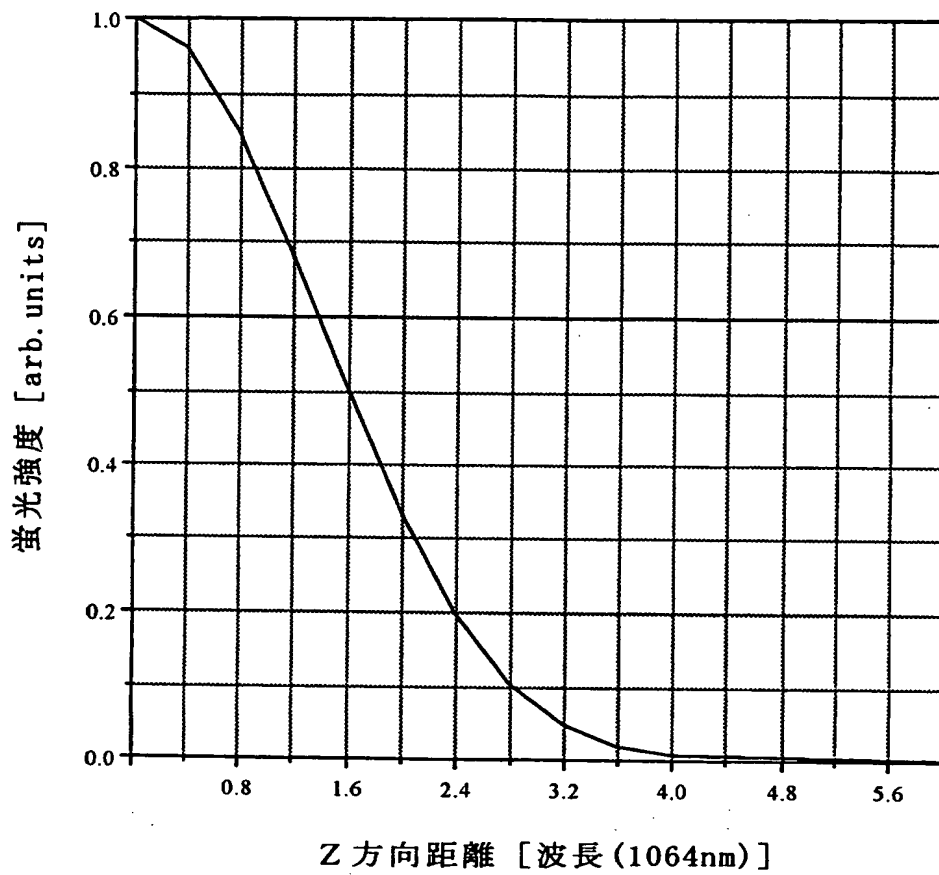
【図19】



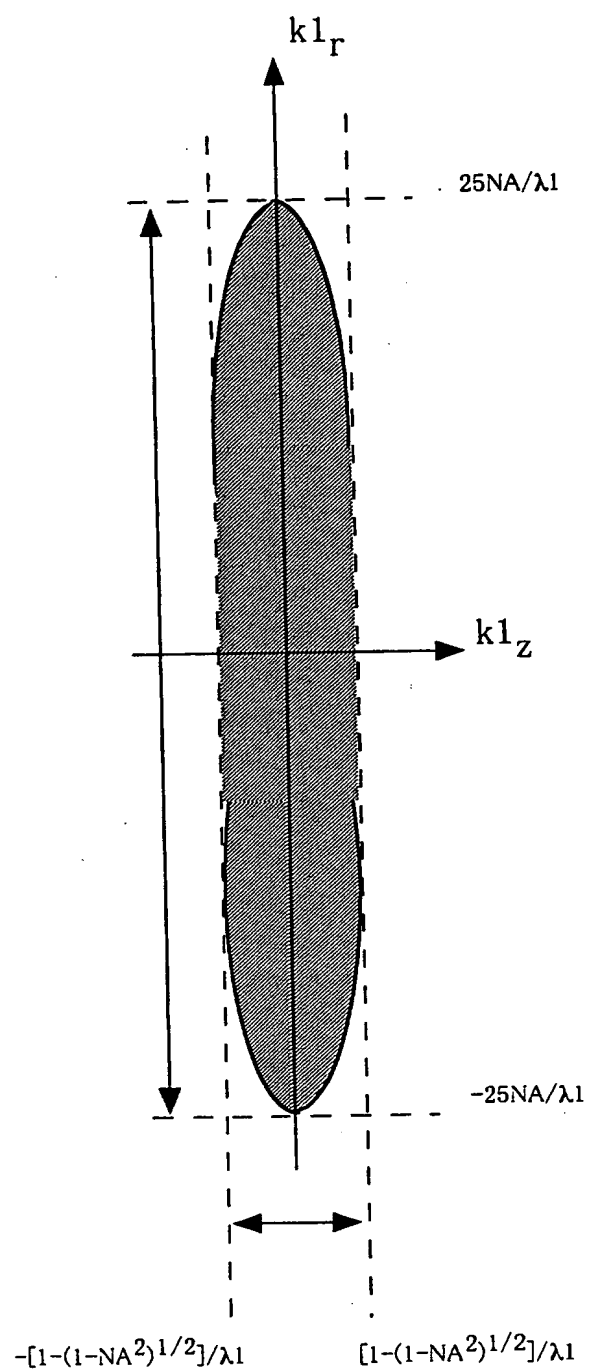
【図20】



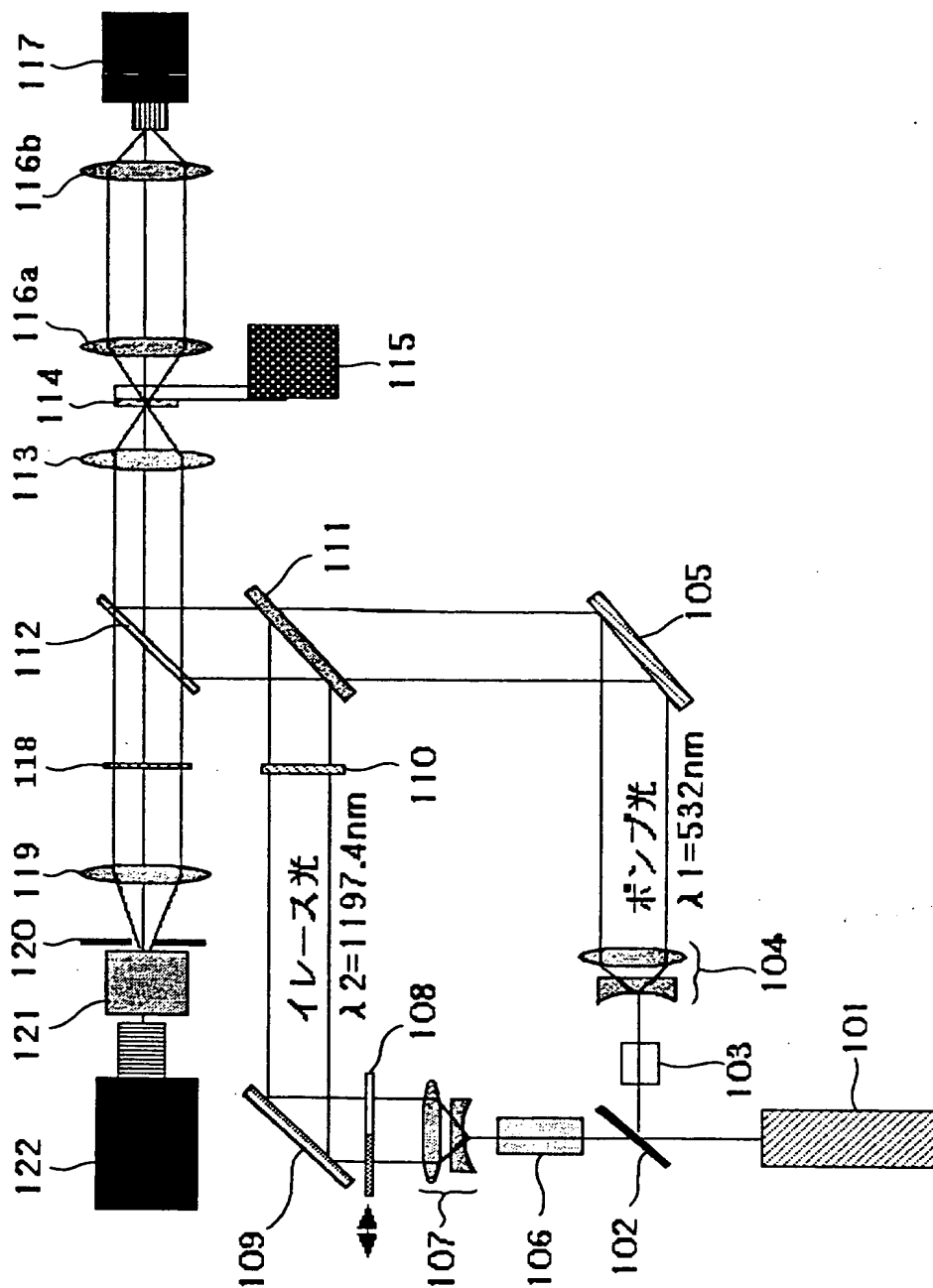
【図 2 1】



【図 22】

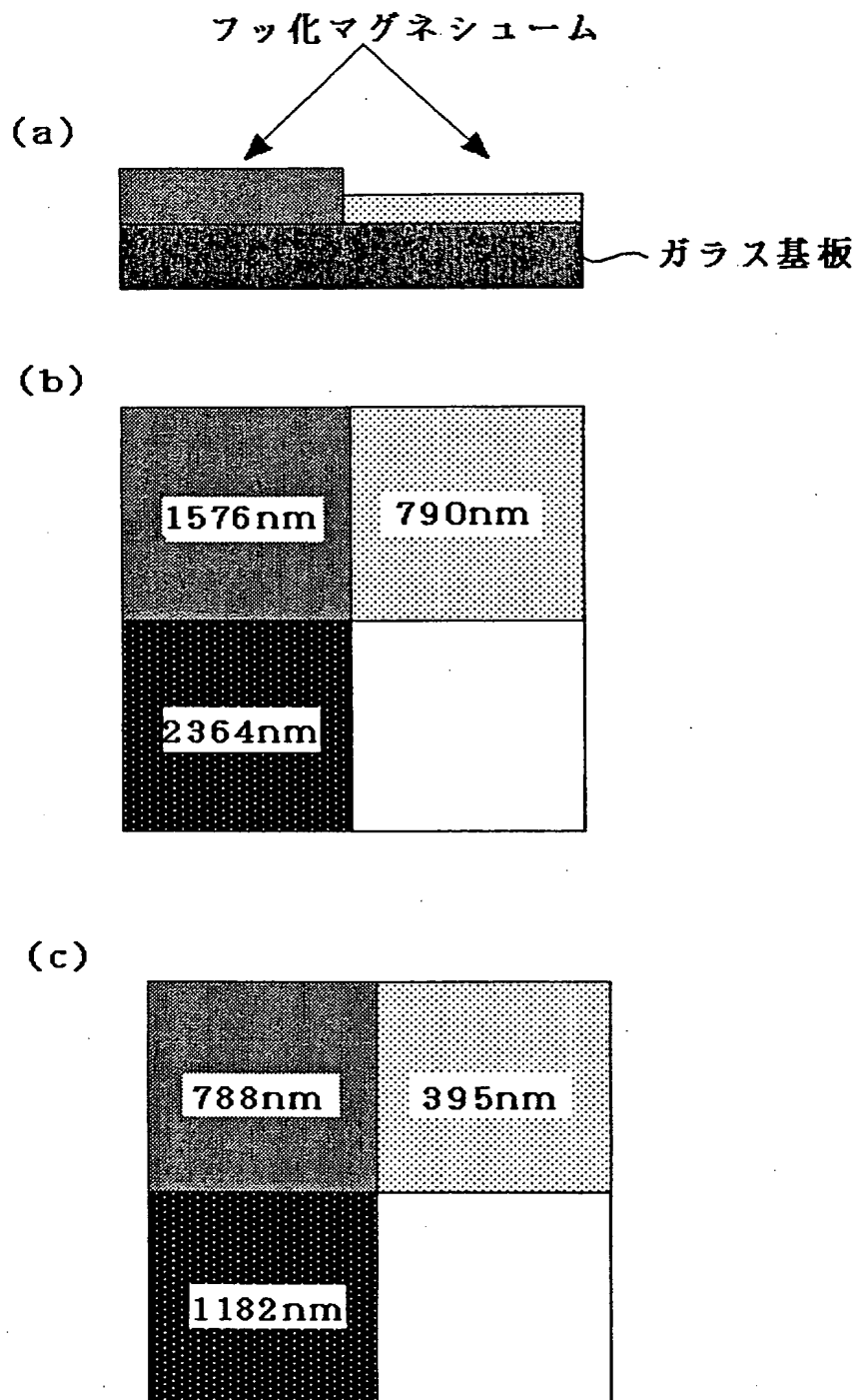


【図 23】





【図 24】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 励起光の蛍光信号への混入に起因した  $S/N$  の劣化を抑制することができ、且つ、優れた三次元空間分解能をも有する、新しい二重共鳴吸収顕微鏡を提供することを課題としている。

【解決手段】 試料分子を基底状態から第一電子励起状態へ励起させるポンプ光の光源と、第一電子励起状態の試料分子を第二電子励起状態またはより高い励起状態へ励起させるイレース光の光源とを備え、各励起状態の試料分子が基底状態へ脱励起する際の発光を検出する二重共鳴吸収顕微鏡において、ポンプ光が、基底状態の試料分子を第一電子励起状態へ励起させる励起エネルギーの  $1/2$  以下である光子エネルギーを有していることを特徴とする二重共鳴吸収顕微鏡。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書  
【提出日】 平成12年 4月19日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2000- 82890  
【補正をする者】  
【識別番号】 000000376  
【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社  
【補正をする者】  
【識別番号】 500130036  
【氏名又は名称】 株式会社日本ローパー  
【代理人】  
【識別番号】 100093230  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 西澤 利夫  
【電話番号】 03-5454-7191  
【手続補正 1】  
【補正対象書類名】 特許願  
【補正対象項目名】 提出物件の目録  
【補正方法】 追加  
【補正の内容】  
【提出物件の目録】  
【物件名】 委任状 2

委任状



平成12年3月14日

私は、

識別番号100093230（弁理士）西澤利夫氏

を以て代理人として下記事項を委任します。

出願2000-82890

1. 特許出願（発明の名称：ニ重文鳥の収容装置）に関する手続  
（登録番号：NP99412-KT）

1. 上記出願又は平成 年 願 第 号に基づく

特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張  
及びその取下げ

1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ

1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求

1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求

1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に  
基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続（権利維持の管理について  
は除く）並びにこれらの権利の放棄

1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録  
に対する登録異議の申立てに関する手続

1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、  
防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関す  
る手続

1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求

1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続

1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ

1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと

1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

オリンパス光学工業株式会社

名 称 代表取締役社長 岸本正壽

代 表 者



委 任 状

平成 12 年 3 月 23 日

私は、

識別番号100093230（弁理士）西 澤 利 夫 氏

を以て代理人として下記事項を委任します。

1. 特願 2000-082890 特許出願 に関する手続
1. 上記出願又は平成 年 願 第 号に基づく  
特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張  
及びその取下げ
1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求
1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に  
基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続（権利維持の管理について  
は除く）並びにこれらの権利の放棄
1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録  
に対する登録異議の申立てに関する手続
1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、  
防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関す  
る手続
1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求
1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続
1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

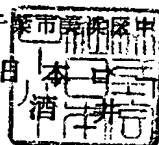
住 所

名 称

代 表 者

〒261-8501 千葉市美浜区中瀬1-3

株式会社 日本酒 代表取締役



D-10E



認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-082890
受付番号	20000780077
書類名	手続補正書
担当官	大井手 正雄 4103
作成日	平成12年 6月 5日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面）	1
---------	-----------------	---

【書類名】 手続補正書  
【提出日】 平成12年 7月 4日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】

【出願番号】 特願2000- 82890

【補正をする者】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 提出物件の目録

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 代理権を証明する書面 1

【援用の表示】 平成12年 7月 4日提出の特願2000-82930  
0に対する手続補正書に添付した委任状を援用する。

(B)20001290079



【整理番号】

委 任 状

複 写

平成12年4月19日

私 儀 識別番号100093230 弁理士 西 澤 利 夫 氏

を代理人として次の事項を委任します。

1. 特許原頁2000-082890 特許原頁2000-082898 特許原頁2000-118633  
特許原頁2000-082893 特許原頁2000-082930 の  
特許出願に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更及び拒絶査定に対する審判の請求並びにその取下げ。
2. 上記出願に基づく特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の優先権主張並びにその取下げ及び優先権主張に伴う後の出願に関する一切の件。
3. 上記出願の分割出願に関する上記事項一切。
4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受ける事項。
5. 第1項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する答弁、取下げその他本件に関する提出書類及び物件の下附を受ける事項。
6. 上記出願に係る特許権に関する一切の手続。ただし、特許権の維持に係る年金納付に関する手続を除く。
7. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続に関する事項。
8. 上記事項を処理するため、復代理人を選任及び解任する事項。



識別番号 396020800

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

科学技術振興事業団

理事長 川 崎 雅 弘





認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2000-082890
受付番号	20001290079
書類名	手続補正書
担当官	大井手 正雄 4103
作成日	平成12年 8月30日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】 396020800

【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】 申請人

【識別番号】 100093230

【住所又は居所】 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階  
西澤国際特許事務所

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000376]

1. 変更年月日 1990年 8月20日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号  
氏 名 オリンパス光学工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [500130036]

1. 変更年月日 2000年 3月23日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 千葉県千葉市美浜区中瀬1-3  
氏 名 株式会社日本ローパー